

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus der Inneren Klinik (Tumorforschung)

**Identifizierung und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen beim
Hepatozellulären Karzinom**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Ivonne Nel
aus Frankfurt (Oder)
2013

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A.-Cl. Hoffmann
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med A. E. Canbay
3. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. S. Beckebaum

Tag der mündlichen Prüfung: 12. August 2014

Aus den Inhalten dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen/Auszeichnungen:

Originalarbeiten in Zeitschriften:

1. Nel I, Ertle J, Baba HA, Weber F, Sitek B, Eisenacher M, Meyer HE, Schlaak JF, Hoffmann AC: Individual profiling of circulating tumor cell composition and therapeutic outcome in patients with hepatocellular carcinoma. Accepted for publication, Journal of Translational Oncology, 2013
2. Nel I, Ertle J, Baba HA, Weber F, Sitek B, Eisenacher M, Meyer HE, Schlaak JF, Hoffmann AC: IGFBP1 in circulating tumor cells as a response marker to selective internal radiation therapy in hepatocellular carcinoma. Submitted to Biomarkers in Medicine, 2013
3. Nel I, Gauler T, Eberhardt W, Nickel AC, Schuler M, Thomale J, Hoffmann AC: Formation and repair kinetics of Pt-(GpG) DNA adducts in extracted circulating tumor cells and response to platinum treatment. In Revision, British Journal of Cancer, 2013

Patentanmeldung:

1. Europäische Patentanmeldung: EP 12 183 492.3; „Method for identifying subgroups of circulating tumor cells (CTCs) in a CTC population or a sample“; Patentanmelder: Hoffmann, Schlaak (DE/DE)

Abstracts:

1. *A novel method for the detection of different subgroups of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma.* I. Nel, J. Ertle, H.A. Baba, F. Weber, B. Sitek, C. Stephan, H.E. Meyer, J.F. Schlaak, A.-Cl. Hoffmann. Poster presentation at the 63rd annual Meeting of the “American Association for the Study of Liver Diseases” (AASLD). Held in Boston, Massachusetts, USA, from 9-13 November 2012.(Nel, Ertle et al. 2012)
2. *IGFBP1 Expression Levels In Circulating Tumor Cells Predict Response To Selective Internal Radiation Therapy (SIRT) In Patients With Hepatocellular Carcinoma.* Ivonne Nel , Judith Ertle , Hideo Baba , Frank Weber , Barbara Sitek , Christian Stephan , Helmut E. Meyer , Jörg F.Schlaak , Andreas-Claudius Hoffmann. Poster presentation at the “International Liver Cancer Association Sixth Annual Conference” (ILCA) held in Berlin, Germany, from 14-16 September 2012.
3. *Detection of epithelial and mesenchymal circulating tumor cell sub-populations in patients with hepatocellular carcinoma.* I. Nel, J. Ertle, H.A. Baba, F. Weber, B. Sitek, C. Stephan, H.E. Meyer, J.F. Schlaak, A.-Cl. Hoffmann. Poster presentation at the “Advances in Circulating Tumour Cells” (ACTC) Meeting held in Athens, Greece, from 26-29 September 2012.

4. *Characterization and potential clinical implications of different subtypes of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma.* Nel I., Baba H. A, Ertle J., Weber F., Sitek B., Stephan C., Meyer H. E, Schlaak J. F, Hoffmann A.-Cl. German Association for the Study of the Liver (GASL) held in Hannover, Germany, from 25-26 January 2013.
5. Pre-therapeutic *ex-vivo* repair kinetics of cisplatin DNA-adducts in circulating tumor cells (CTC) as platinum resistance test. I. Nel, T.C. Gauler, A.C. Nickel, S. Alotaibi, J. Thomale, M. Schuler, A.-C-. Hoffmann. BTOG Annual Meeting, Dublin Jan 2013,

Poster Preis

1. EINLEITUNG	7
1.1. ÄTIOLOGIE DES HEPATOZELLULÄREN KARZINOMS	7
1.2 DIAGNOSTIK	9
1.3 SELEKTIVE INTERNE RADIOTHERAPIE (SIRT)	10
1.4 ZIRKULIERENDE TUMORZELLEN (CTC)	11
1.5 DAS EPITHELIALE ZELLADHÄSIONSMOLEKÜL EPCAM	12
1.6 EPITHELIAL-MESENCHYMALE TRANSITION (EMT)	13
1.7 ISOLIERUNGS-UND DETEKTIONSMETHODEN FÜR CTC	13
1.8 AUSGEWÄHLTE MOLEKULARE MARKER BEIM HCC	15
2. ZIELSTELLUNGEN	17
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 MATERIAL	18
3.2 GERÄTE	18
3.3 CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	19
3.4 KOMMERZIELLE KITS	20
3.5 IMMUNOMAGNETISCHE TEILCHEN (BEADS)	20
3.6 ANTIKÖRPER	21
3.7 PRIMER	22
3.8 METHODEN	22
4. ERGEBNISSE	31
4.1 METHODENETABLIERUNG ZUR CTC-ISOLIERUNG UND -IDENTIFIZIERUNG	31
4.2 CHARAKTERISIERUNG VON CTC-SUBPOPULATIONEN	42
4.3. MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG VON CTC	52
4.4 KULTIVIERUNG VON CTC	73
5. DISKUSSION	80
5.1 ISOLIERUNG, DETEKTION UND CHARAKTERISIERUNG VON CTC	80
5.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE ANALYSEN VON CTC	84
5.3 KULTIVIERUNG VON CTC	86
ZUSAMMENFASSUNG	88
REFERENZEN	89
ANHANG	94
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94

DANKSAGUNG	97
LEBENS LAUF	98

1. EINLEITUNG

1.1. Ätiologie des Hepatozellulären Karzinoms

Das Hepatozelluläre Karzinom („hepatocellular carcinoma“; HCC) steht weltweit an fünfter Stelle bei den neu-diagnostizierten Krebserkrankungen und ist die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern (Jemal, Bray et al. 2011) (Abb. 1). Im Jahr 2008 traten etwa 748'300 HCC-Neuerkrankungen und 695'900 HCC-bedingte Todesfälle auf. Weltweit ist die HCC-Rate bei Männern etwa doppelt so hoch wie bei Frauen. In Ost- und Südostasien sowie in den afrikanischen Ländern südlich der Sahara ist die Rate der HCC-Erkrankungen besonders hoch (Di Bisceglie, Rustgi et al. 1988; Jemal, Bray et al. 2011) (Abb. 2). Die größten Risikofaktoren sind die Hepatitisviren B (HBV) und C (HCV), die mehr als 80% aller HCC-Fälle weltweit verursachen (Wang, Hussain et al. 2002). Mehr als 50% aller HCC-Fälle sind die Folge einer chronischen HBV-Infektion und ca. 25 % entstehen aufgrund von HCV (Gurtsevitch 2008). Chronische Lebererkrankungen wie HBV und HCV führen zur Bildung von fibrotischem (Binde-)Gewebe und zum Absterben von Hepatozyten und Absinken des Regenerationsvermögens der Leber. Folglich kommt es zur Entstehung von Leberzirrhose und tumorösen Knoten (Caillot, Derambure et al. 2009). Weitere Faktoren, die neben einer Virusinfektion eine wichtige Rolle bei der Bildung eines HCC einnehmen, sind Aflatoxin B₁-kontaminierte Lebensmittel (v.a. China) und Zigaretten- bzw. starker Alkoholkonsum (v.a. westliche Länder). Die Mehrheit der HCC-Erkrankungen geht auf alkoholbedingte Zirrhose und nicht-alkoholische Fettleber Erkrankungen (NAFLD) in Zusammenhang mit dem metabolischen Syndrom, Typ 2 Diabetes Mellitus und Fettleibigkeit zurück (Sass, Chang et al. 2005), wobei insbesondere die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) in Verbindung mit diesen Komorbiditäten das Zirrhose- und HCC-Risiko erhöht (Bugianesi, Vanni et al. 2007; El-Serag 2007; Sanyal, Yoon et al. 2010). Neben genetisch bedingten Erkrankungen (Hämochromatose, Wilson-Erkrankung, Porphyrie, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel) stellen oxidativer Stress und chronische Entzündungen ein erhöhtes HCC-Risiko dar. Es wird angenommen, dass oxidativer Stress und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zu Genmutationen und somit zu veränderter Funktionalität von Proteinen führen können, die eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, im Zellzyklus und bei der Apoptose spielen (Wang, Hussain et al. 2002) (Abb.3).

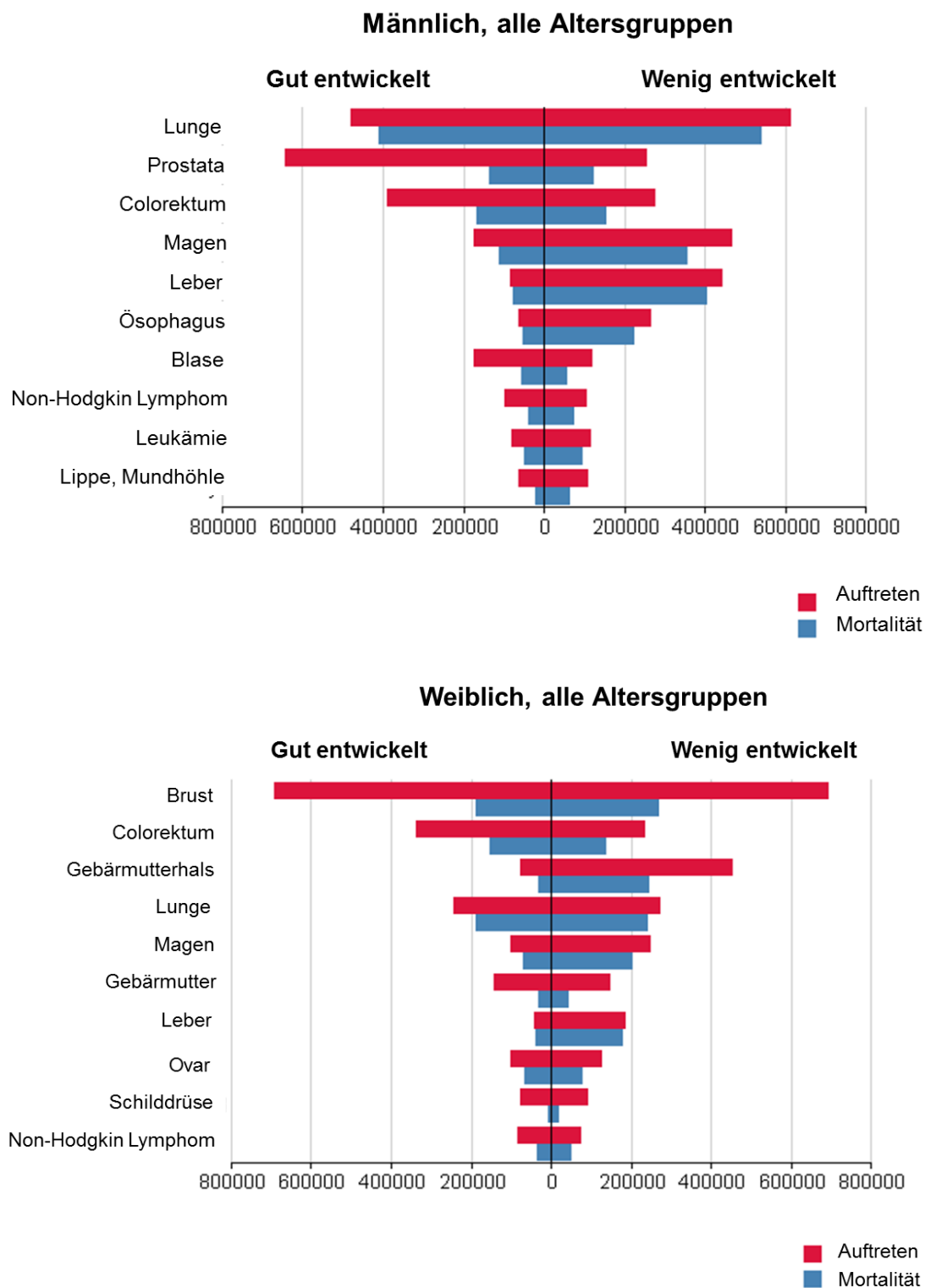


Abb. 1: Geschätzte Anzahl neuer Erkrankungen und Todesfälle der häufigsten Tumorentitäten weltweit in Abhängigkeit vom wirtschaftlichen Entwicklungsstand, 2008. (Ferlay J 2010; Jemal, Bray et al. 2011)

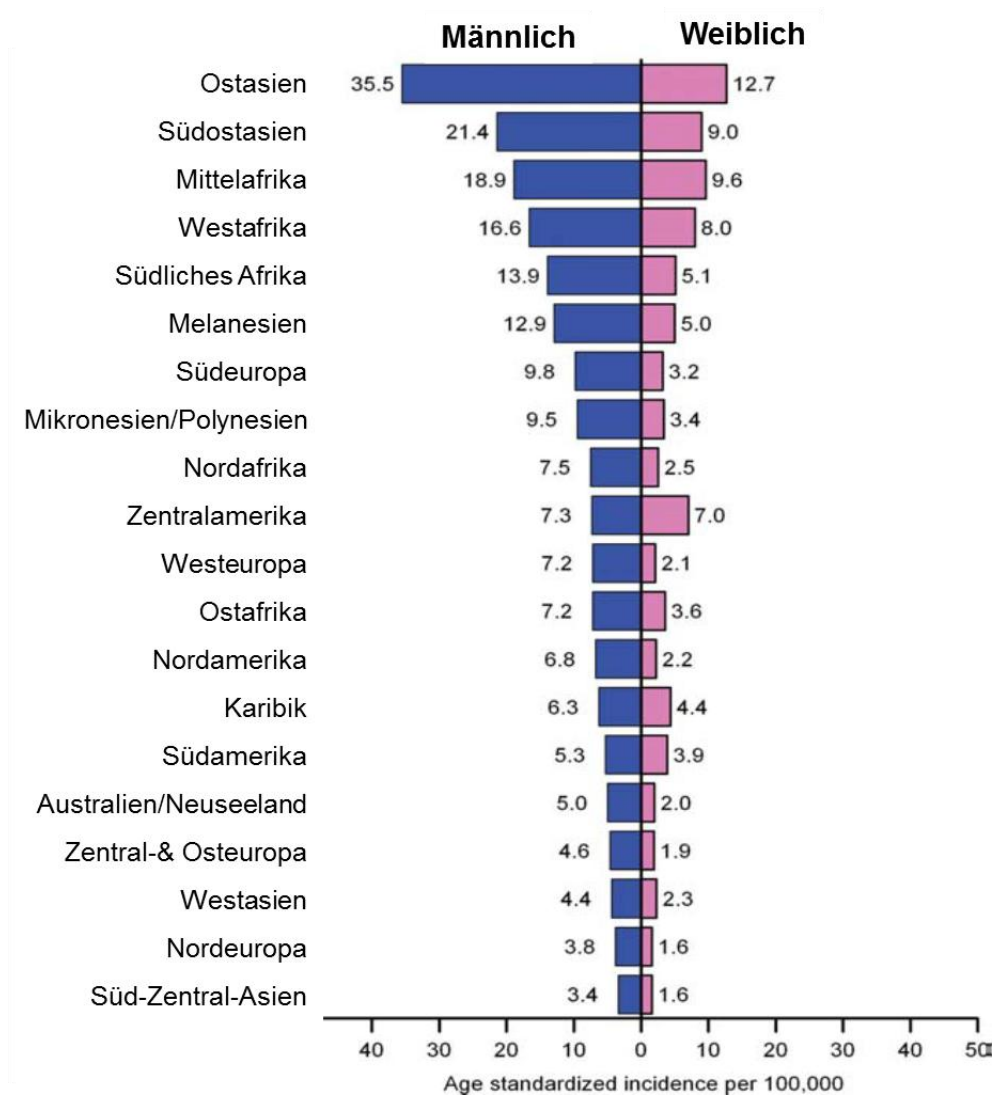


Abb. 2: Nach Alter und Geschlecht aufgeteilte HCC-Häufigkeitsrate in verschiedenen Gebieten der Welt, 2008.(Jemal, Bray et al. 2011)

1.2 Diagnostik

Die Diagnose Hepatozelluläres Karzinom wird durch bildgebende Verfahren, wie Sonographie, Computertomographie und Magnetresonanztomographien in Kombination mit der Bestimmung des Serum-Alpha-Fetoproteins (AFP) gestellt (Caselmann, Blum et al. 1999). Weitere Serummarker wie das Lens Culinaris Agglutinin-reaktive AFP (AFP-L3) und Des-Gammaprothrombin (DCP) scheinen die Sensitivität zu erhöhen (Ertle, Wichert et al. 2011). Histopathologische Untersuchungen von Tumorbiopsien erhöhen die Spezifität, führen jedoch zu einer höheren Komplikationsrate für Patienten. Das Blutungsrisiko bei Biopsien wird auf 0,1–1% geschätzt; das Risiko für das Verschleppen von Tumorzellen in den Stichkanal und somit das Entstehen von Stichkanalmetastasen wird in einigen Studien mit 2% angegeben (Durand, Regimbeau et al. 2001). Wiederholte Biopsien, wie sie

beispielsweise bei einer molekularen oder zellulären Verlaufskontrolle notwendig wären, würden diese Risiken vermutlich deutlich erhöhen.

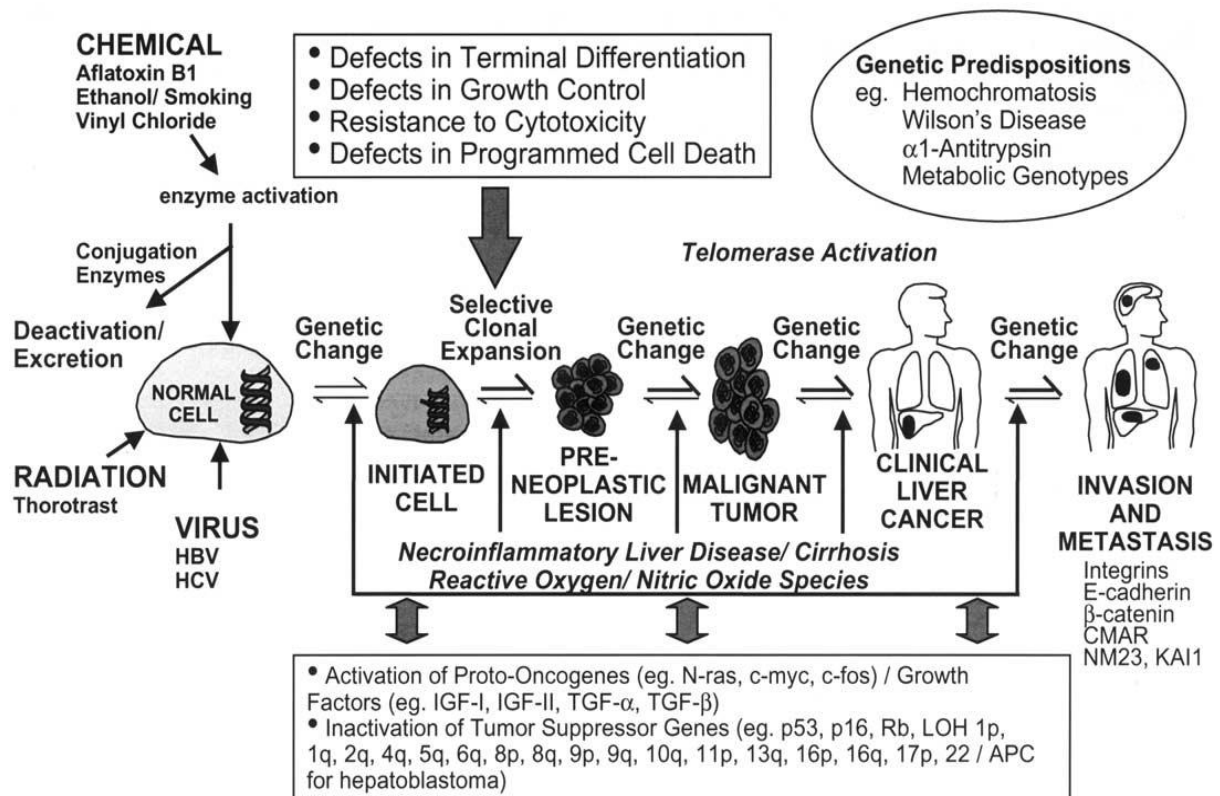


Abb. 3: Prinzip der Hepatokarzinogenese (Wang, Hussain et al. 2002).

1.3 Selektive interne Radiotherapie (SIRT)

Bei Patienten mit einem HCC im Frühstadium bestehen mit chirurgischer Resektion, Lebertransplantation oder ablativen Verfahren kurative Behandlungsoptionen, die jedoch mit einer hohen Rezidivrate einhergehen. In mehr als 50% der Fälle tritt das HCC innerhalb von 3 Jahren nach Resektion wieder auf, welches zu einer deutlichen Verkürzung des Langzeitüberlebens führt (Belghiti, Panis et al. 1991; Sheen, Jeng et al. 2004). Bei Patienten mit fortgeschrittenem HCC sind neben wenigen systemisch wirksamen Agenzien wie dem Tyrosinkinaseinhibitor Sorafenib hauptsächlich lokale Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE) etabliert (Davis, Dempster et al. 2008).

Bei Patienten mit einem multifokalen oder großen HCC bzw. einer Pfortaderinfiltration kommt die Selektive Interne Radiotherapie (SIRT), die eine spezielle Form der internen Strahlenbehandlung darstellt, zum Einsatz (Radeleff, Stampfl et al. 2012). Hierbei werden ähnlich dem TACE-Verfahren wenige Mikrometer große (Durchmesser 20–60 μ m), mit Yttrium-90 angereicherte Glas- oder Harzpartikel direkt in die HCC-Knoten eingebracht. Neben ihrer radiogenen Wirkung (ca. 200 Gy im Lebertumor; übrige Leber ca. 15 Gy)

reduzieren die Mikropartikel als Embolisat auch die Durchblutung der Tumoren und führen somit zur Tumorphypoxie und zum Absterben der bösartigen Zellen. Salem und Kollegen verglichen das mediane Überleben von Patienten, die eine TACE oder eine SIRT erhalten hatten, und wiesen eine längere progressionsfreie Zeit in der SIRT-Gruppe nach (13,3 Monate vs. 8,4 Monate) (Salem, Lewandowski et al. 2011). Krankheitskontrolle (Stable Disease; SD) ist bei den meisten Patienten das zu erreichende Ergebnis einer SIRT (Kulik, Carr et al. 2008).

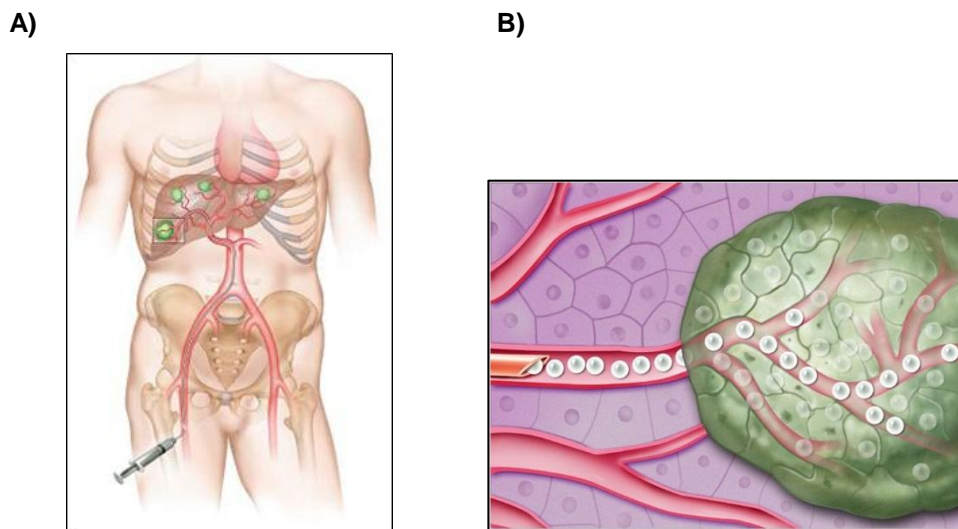


Abb. 4: SIRT: A) Über einen in der Leiste einliegenden Katheter werden die mit Yttrium-90 angereicherten Glas- oder Harzpartikel gezielt verabreicht. B) Im Kapillarbett des Tumors setzen sich die Partikel fest und entfalten dort ihre Wirkung (Welsh, Kennedy et al. 2006; Jakobs, Hoffmann et al. 2007).

1.4 Zirkulierende Tumorzellen (CTC)

CTC werden als Tumorzellen definiert, die entweder vom Primarius oder einer Metastase freigesetzt werden und im peripheren Blut von Patienten zirkulieren (Abb.5) (Allard, Matera et al. 2004). Die tumorinduzierte Angiogenese fördert die Invasion von CTC und dadurch die Bildung von Metastasen in anderen Organen oder dem Ursprungsorgan selbst (Kim, Oskarsson et al. 2009). In den letzten Jahren gelangten die CTC immer mehr in das wissenschaftliche Interesse, da sie möglicherweise eine Anwendung als Biomarker erfahren könnten (Krebs, Hou et al. 2012). Dabei existiert die Vorstellung, dass CTC als sogenannte „liquid biopsy“ insbesondere zur Beobachtung von Therapieansprechen bzw. Krankheitsverläufen geeignet sind, während die bisher vorherrschende Analyse von prätherapeutischem Gewebe eher eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Gewinnung darstellt (Hoffmann, Hartmann et al. 2009; Lianidou, Mavroudis et al. 2010). So basiert nicht

nur die Klassifizierung maligner Patienten in klinischen Routineverfahren auf dem Profil des Primärtumors, sondern auch die immer wichtiger werdende molekular- oder zytogenetische Analyse des Tumorgewebes. Dadurch wird jedoch nicht berücksichtigt, dass die Entstehung von Resistenzen mit einer tumorseitigen Veränderung einhergeht und auch zu modulierten Expressionsmustern der CTC führt (Pestrin, Bessi et al. 2009; Tewes, Aktas et al. 2009; Sun, Yang et al. 2011). Die Reaktion der CTC auf eine Therapie könnte als Biomarker bildgebenden Verfahren überlegen sein (Nakamura, Yagata et al. 2010). Die minimal-invasive Blutabnahme während der Therapie könnte die Evaluation des Ansprechens basierend auf molekularen oder zellulären Profilen der CTC zeitnaher und individueller ermöglichen als andere derzeit etablierte Verfahren (Christoph, Hoffmann et al. 2012).

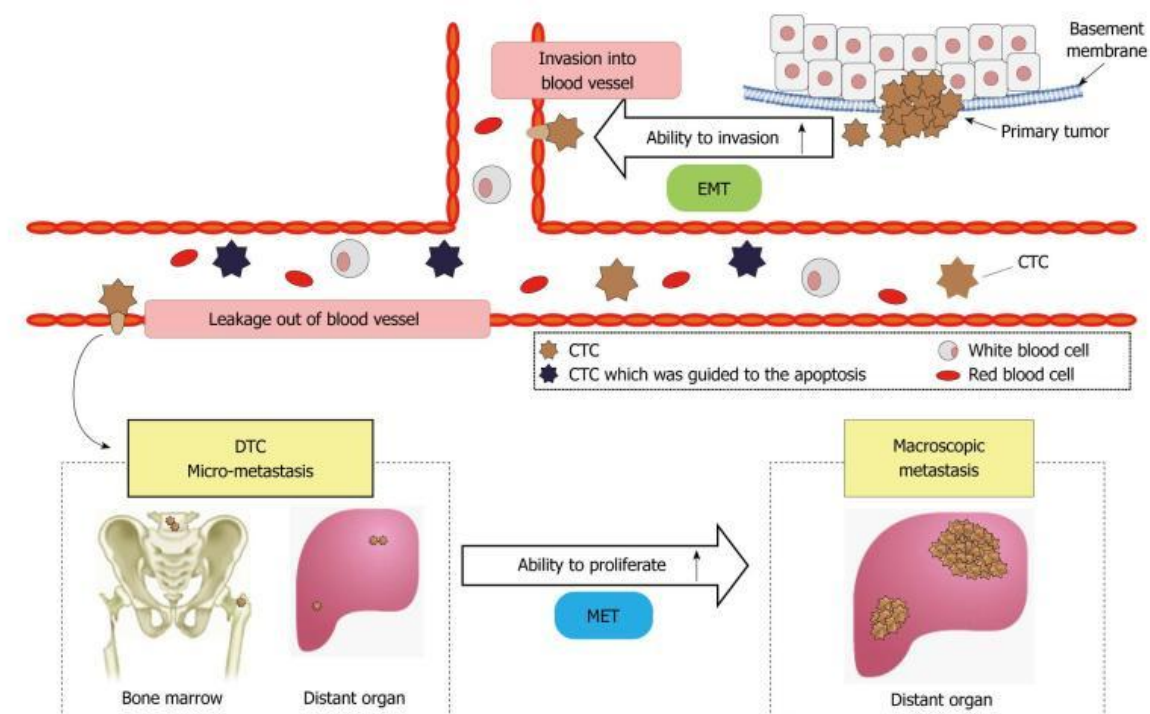


Abb.5. Metastasierungsmodell (Park, Kitahara et al. 2011). EMT: Epithelial-mesenchymale Transition. CTC: zirkulierende Tumorzelle; DTC: Disseminierte Tumorzelle; MET: Mesenchymal-epitheliale Transition.

1.5 Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM

EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) wird der Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) zugeordnet und ist exklusiv auf den Oberflächen von epithelialen Zellen und Tumorzellen epithelialer Karzinome exprimiert, wodurch diese von mesodermalen und ectodermalen Tumoren wie beispielsweise den Sarkomen, Melanomen oder Lymphomen unterscheidbar werden (Moldenhauer, Momburg et al. 1987; Momburg, Moldenhauer et al.

1987). Viele Adhäsionsmoleküle (CAMs) wurden bisher charakterisiert und vor allem Funktionen der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Zellmigration, Zellzyklus, Signaling und Morphogenese während der Entwicklung und Regeneration von Gewebe zugeordnet (Okegawa, Pong et al. 2004). Das auf vielen Karzinomen überexprimierte EpCAM ist ein Kandidatenprotein für Tumordiagnose und -therapie (Trzpis, McLaughlin et al. 2007).

1.6 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Die umfassende Darstellung und Charakterisierung von CTC ist aufgrund der großen Heterogenität dieser Zellgruppe bisher unvollständig (Klein, Blankenstein et al. 2002). Während der Metastasierung können die Zellen im Rahmen der sogenannten epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) (Mulholland, Kobayashi et al. 2012) epitheliale Eigenschaften, wie Oberflächenmarker EpCAM und intrazelluläre Zytokeratine (CK), ablegen und mesenchymale Merkmale, wie die Expression von Vimentin und N-Cadherin, entwickeln (Christofori 2006; Thiery and Sleeman 2006). Dadurch verlieren epitheliale Zellen die Zell-Zell-Adhäsion und die apikale-basale Polarität und erlangen mesenchymale Eigenschaften wie Bewegungsvermögen, Invasivität und Apoptoseresistenz, welche zum Überleben im Blutstrom beitragen (Barrallo-Gimeno and Nieto 2005; Hanahan and Weinberg 2011). Dabei führt die EMT zu erhöhter Tumorzellmigration und -invasion durch Schwächung der Zell-Zell-Kohäsion, der Fähigkeit zum Matrixabbau und der Modifizierung des Zytoskeletts. Es konnten bereits unterschiedliche Signalwege als auslösend für eine EMT identifiziert werden. Diese sind entweder in die Kooperation zwischen TGF β 1 und Ras oder anderen Rezeptortyrosinkinasen involviert, oder Bestandteil der Wnt-, Notch- und Hedgehog-Signaltransduktion (Moustakas and Heldin 2007). Durch Weinberg, Mego und andere konnten EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren, wie TWIST1, SNAIL1, SLUG, ZEB1 und FOXC2 identifiziert werden (Yang and Weinberg 2008; Mego, Mani et al. 2012). Gradilone und Kollegen konnten zeigen, dass der Nachweis von CTC mit mesenchymalen Expressionsmustern bei Patientinnen mit Brustkrebs mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist als der alleinige Nachweis CK-exprimierender Zellen (Gradilone, Raimondi et al. 2011). Zelltypen, die Vimentin jedoch kein CK exprimieren, konnten auch in anderen Entitäten, wie dem Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (non-small lung cancer; NSCLC), nachgewiesen werden (Hofman, Ilie et al. 2011).

1.7 Isolierungs- und Detektionsmethoden für CTC

Bei einer geschätzten Zahl von 1 CTC in 10^6 - 10^7 Leukozyten ist die Isolierung und Detektion von CTC a priori vor große analytische Herausforderungen gestellt (Lin, Balic et al. 2011). Es existieren keine tumorzellspezifischen Marker, die eine vollständige und zweifelsfreie CTC-

Detektion ermöglichen. Heterogenität und Plastizität der CTC-Subpopulationen erschweren die Detektion zusätzlich (Riethdorf and Pantel 2010; Lianidou and Markou 2011).

Im Grundsatz bestehen die bisher etablierten CTC-Detektionsmethoden aus zwei Schritten - Anreicherung und Identifizierung (Abb. 6). Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll macht sich die unterschiedliche Dichte von nukleären Zellen und anderen Blutbestandteilen zu Nutze, um eine Präselektion aus Vollblut zu ermöglichen. Für die weitere Anreicherung der CTC in dieser aus peripherem Blut gewonnen Suspension der mononukleären Zellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMNC) gibt es Methoden, die auf positiver oder negativer Selektion durch mit spezifischen Antikörpern gegen epitheliale bzw. hämatopoetische Marker beschichteten magnetischen Teilchen, sogenannten Beads, basieren. Das von der amerikanischen Arzneimittelbehörde (Food and Drug Administration, FDA) für den Einsatz in der Klinik zugelassene CellSearch® System verwendet Antikörper gegen EpCAM zur Quantifizierung von CTC bei Karzinomen der Brust, des Dickdarms und der Prostata (Allard, Matera et al. 2004; Riethdorf, Fritsche et al. 2007). Als weitere Verfahren sind der Nachweis spezifischer molekularer Marker mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und insbesondere bildgebende Ansätze (Immunzytologie, Immunfluoreszenz) zu nennen (Lianidou and Markou 2011). Da die meisten Tumorzellen keine tumorspezifischen Antigene besitzen, sind epitheliale Antigene wie CK, Oberflächenadhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren bevorzugte Marker für die Detektion (Lacroix 2006; Pantel, Brakenhoff et al. 2008). Die Identifizierung mit CK ist derzeit die standardisierte allgemeingültige Herangehensweise, da im Blut von gesunden Spendern keine oder nur sehr wenige CK-positive Zellen vorkommen sollten (Allard, Matera et al. 2004; Pantel, Deneve et al. 2012). Bildgebende Verfahren bieten hier den Vorteil der Gegenfärbung mit dem Leukozytenmarker CD45, um falsch-positive Ereignisse auszuschließen. Weiterhin machen diese Ansätze eine weitere morphologische Untersuchung der Zellen möglich.

Auch beim HCC ergibt sich das Problem der fehlenden spezifischen Antikörper gegen HCC-Zelloberflächenantigene. Es existieren bisher nur wenige Studien, die unter Verwendung der oben beschriebenen Ansätze, CTC beim HCC nachweisen bzw. untersuchen konnten (Waguri, Suda et al. 2003; Vona, Estepa et al. 2004; Guo, Yao et al. 2007; Schulze, Beneken et al. 2011; Xu, Cao et al. 2011; Sun, Xu et al. 2012; Liu, Li et al. 2013).

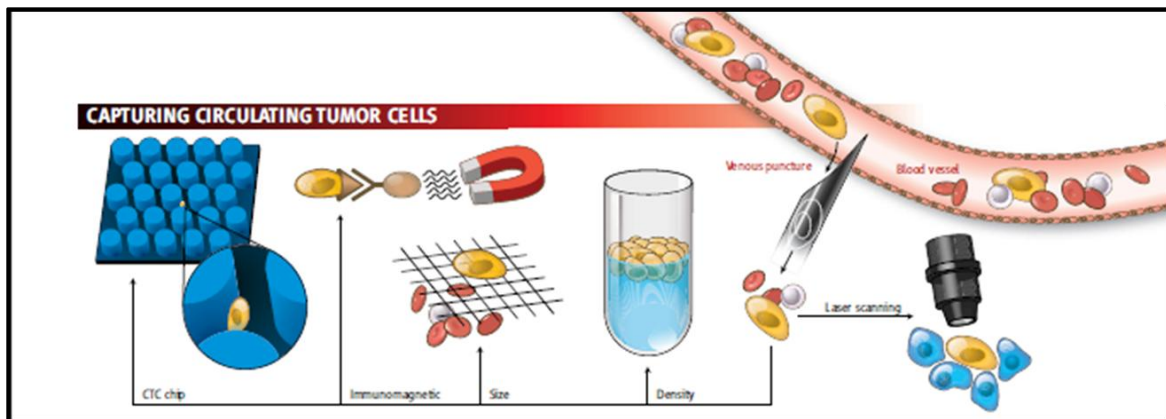


Abb. 6: CTC-Anreicherungsverfahren. Es gibt verschiedene Vorgehensweisen zur Anreicherung der seltenen CTC (gelb) aus dem Blut, wie z.B. den CTC-Chip, der auf einem mikrofluidischen Ansatz beruht, wobei Blutzellen durchströmen und EpCAM-positive CTC zurückgehalten werden; Immunomagnetische Beads, die mit Antikörpern beschichtet sind; Filtersysteme, die Zellen bestimmter Größe anreichern; Dichtegradientenzentrifugation und Laserdetektion. Anschließend werden die Zellen mittels Antikörper oder genetischer Analysen identifiziert und charakterisiert (Kaiser 2010).

1.8 Ausgewählte molekulare Marker beim HCC

Insulinähnliche-Wachstumsfaktoren-bindende Proteine (IGFBP): Das IGFBP-1 (Insulin-like growth factor-binding protein 1) wird zum großen Anteil in der Leber synthetisiert. Durch Bindung insulinähnlicher Wachstumsfaktoren, begrenzt es IGF-induziertes Zellwachstum und Differenzierung. Ging und Kollegen konnten in einer Studie zeigen, dass die *IGFBP1* mRNA-Expressionen signifikant niedriger in HCC-Gewebeproben waren als in zirrhotischen und gesunden Lebergeweben. Hieraus schlossen sie auf eine negative Korrelation des *IGFBP* mit Entwicklung und Wachstum von HCC (Gong, Cui et al. 2000).

Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Aktivator (HGFAC): Der HGFAC (Hepatocyte growth factor activator) ist eine Serinprotease, die den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) in seine aktive Form konvertiert, welcher eine Rolle bei der Stimulierung des Hepatozytenwachstums und der Regulierung der Leberregeneration spielt (Yanagita, Nagaike et al. 1992; Huh, Factor et al. 2004). In der Literatur wurde eine erhöhte *HGFAC*-Expression unter Hypoxie in Abhängigkeit von der Expression des Hypoxie-induzierenden-Faktors-1 α (Hif1 α) bei Pankreaskarzinomen beschrieben (Kitajima, Ide et al. 2008).

Hif1 α : Hypoxie ist eine logische Konsequenz eines stetig wachsenden Tumors (Vaupel, Thews et al. 2001). Hif1 α ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zellantwort auf die hypoxische Umgebung reguliert und der bereits in einigen Studien mit dem Ansprechen auf Therapie oder der Prognose von Patienten mit unterschiedlichen Entitäten korreliert werden konnte (Hoffmann, Mori et al. 2008; Hoffmann, Danenberg et al. 2009). Die Neovaskularisierung und

auch die Expression verschiedener Hypoxie-Response-Gene kann durch *Hif1α* aktiviert werden, wodurch HCC-Tumorwachstum, Infiltration, Metastasierung und Prognose beeinflusst werden (Liao and Johnson 2007; Weidemann and Johnson 2008).

Transformierender Wachstumsfaktor beta (TGFβ): TGFβ (Transforming growth factor beta) ist ein wichtiger Regulator zellulärer Prozesse wie Wachstum und Differenzierung, beispielsweise die Inhibierung regenerativen Wachstums in der Leber durch Induzierung von Apoptose (Yao, Dong et al. 2007). Insbesondere bei HCV-bedingten Lebererkrankungen einschließlich der Fibrose und dem HCC, konnte TGFβ nachgewiesen werden (Yang, Inokuchi et al. 2013). TGFβ konnte auch mit der EMT von Hepatozyten, welche mesenchymale Phenotypen und die Funktionen aktivierter hepatischer Sternzellen annehmen können, assoziiert werden (Bortolami, Cardin et al. 2008; Bi, Yang et al. 2012).

Adenomatous polyposis coli (APC): APC ist Teil des Wnt-Signaltransduktionsweges und von essentieller Bedeutung für die Karzinogenese. Bisherige Studien lassen vermuten, dass APC verschiedene Rollen in den fundamentalen Zellprozessen einschließlich Zelladhäsion, Migration und Chromosomentrennung spielt (Aoki and Taketo 2007).

Alpha-Fetoprotein (AFP): Serum-AFP ist der in der klinischen Anwendung am weitesten verbreitete Marker zur Detektion und Diagnosesicherung von HCC. *AFP* mRNA ist ein möglicher molekularer Biomarker, der mit Metastasierung und Wiederauftreten von HCC korreliert und der für die Einschätzung der individuellen Prognose geeigneter sein könnte (Zhou, Liu et al. 2006; Guo, Yao et al. 2007).

Keratin 19: Eine erhöhte *Keratin 19*-Expression konnte beim HCC mit einer schlechteren Prognose und höheren Rate an Lymphknotenmetastasierung und Rezidiven assoziiert werden (Roskams, De Vos et al. 1998; Uenishi, Kubo et al. 2003; Yang, Xu et al. 2008; Zhuang, Zhang et al. 2008). Tsuchiya und Kollegen beschrieben bei 90% der Keratin 19-positiven HCC-Patienten ein Rezidiv nach Radiofrequenzablation und zeigten, dass Keratin 19-Positivität signifikant mit einem frühen Rezidiv assoziiert ist (Tsuchiya, Komuta et al. 2011).

2. ZIELSTELLUNGEN

1. Etablierung einer geeigneten Methode zur Identifizierung und Darstellung heterogener zirkulierender Tumorzellen beim HCC
 - a. Morphologische, mikroskopiebasierte qualitative Erfassung und Beschreibung der vorhandenen zirkulierenden Zelltypen
 - b. Erstellung von CTC-Profilen basierend auf den Untergruppen und Korrelation dieser Profile mit dem klinischen Verlauf
2. mRNA Expressionsmessung in epithelialen CTC
 - a. Nachweis der Anreicherung epithelialer, EpCAM-positiver CTC
 - b. Verlaufsmessung von bekannten oder in Gewebeproben definierten prädiktiven und prognostischen Markern, die mit dem Ansprechen auf lokal-ablative oder systemische Verfahren korrelieren
3. Kultivierung von CTC
 - a. Überprüfung der Proliferationsfähigkeit nativer CTC in Kultur
 - b. Erweiterung der Kurzzeitkultivierung auf klinische Anwendungen bei anderen Entitäten (Cisplatin *ex vivo* Test)

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Plastikmaterial für die Aufarbeitung der Blutproben sowie für die Zellkulturen, die RNA-Extraktion und die PCR wurden von den Firmen Greiner Bio-One, Eppendorf, Thermo Fisher Scientific, BD Biosciences, Nerbe Plus und Roche verwendet. Objektträger aus Glas wurden von den Firmen Marienfeld und Hologic benutzt.

3.2 Geräte

Gerät	Marke
Färbegerät	Autostainer; DAKO
Fluoreszenzmikroskop	BZ9000 Model BIOREVO; Keyence
Inkubator	HeraCell 240i; Thermo Fisher Scientific
Magnetpartikelprozessor	KingFisher mL; Thermo Fisher Scientific
Mikroskop (automatisiert)	Ariol-SL 50 (Applied Imaging)
Mikroskop	LeitzDialux 20 EB
Mikroliterzentrifuge	Mikro 220R; Hettich Lab Technology
Mikrovolumen-Spektrophotometer	NanoDrop 1000; PEQLab
Objektträger-Automat	ThinPrep Processor 2000; Hologic, Inc
PCR Analysesystem	LightCycler 480; Roche Diagnostics
PCR Workstation	PEQLab
Pipetten	Eppendorf und Gilson
Pipettierhilfe	Pipettus; Hirschmann Laborgeräte
QIAcube	Qiagen
Sterilbank	Gelaire BSB4; Flow Laboratories
Thermoschüttler	Grant-bio; Grant Instruments
Tischzentrifuge	Rotanta 46 RS; Hettich Lab Technol
Vortexer	Paramix II; Julabo
Wasserbad	Memmert
Zellzähler	Countess automated cell counter; Invitrogen

Zyto-Zentrifuge

Cellspin II; Tharmac

3.3 Chemikalien und Lösungen

Bovine Serum Albumin (BSA)

Sigma-Aldrich

Anti-Fading Medium Prolong Gold

Invitrogen

CytoLyt-Lösung

Hologic, Inc.

Dexamethason

Sigma-Aldrich

Dithiothreitol (DTT)

Sigma-Aldrich

DMEM

PAA Laboratories GmbH

EpiCM Epithelial Cell Medium

Sciencell

F10 Nutrient Mixture (Ham)

Gibco

FBS Superior

Biochrom AG

FCR-Blocking Reagent

Miltenyi Biotec GmbH

Ficoll Paque Plus

GE-Healthcare

Formaldehyd-Lösung

Otto Fischar GmbH

Gentamycin

Sigma-Aldrich

Hepato-Stim Kulturmedium

BD

HEPES Puffer

Sigma-Aldrich

HMM Hepatozytenkulturmedium

Lonza

Insulin-Lösung, human

Sigma-Aldrich

Kollagen Typ I Lösung

Sigma-Aldrich

L-Ascorbinsäure

Sigma-Aldrich

Liquid Fast Red

Thermo Fisher Scientific

L-Ornithin Monohydrochlorid

Sigma-Aldrich

Lysispuffer RLT

Qiagen

Mayer's Hämatoxylin

Thermo Fisher Scientific

Milchpulver

Carl Roth GmbH

MITO plus Serum Extender

BD Bioscience

Non-Essential-Aminoacids (NEAA)

PAA Laboratories GmbH

PBS	Invitrogen
Percoll Plus	GE-Healthcare
Perm/Wash	BD Biosciences
Primary Antibody Amplifier	Thermo Fisher Scientific
Quanto AP-Polymer	Thermo Fisher Scientific
Rinderhypophysenextrakt (BPE)	BD Bioscience
Sodium Pyruvat	PAA Laboratories GmbH
TBS Tween	Thermo Fisher Scientific
Triton-X	Fluka
Tween 20	Fluka
Ultra V Block	Thermo Fisher Scientific
Vitamin-Lösung	Sigma-Aldrich

3.4 Kommerzielle Kits

Cellular Senescence Assay Kit	Chemicon; Merck Millipore
Dakocytomation APAAP Kit	DAKO
LSAB TM +/HRP-Kit	DAKO
KingFisher Total RNA Kit	Thermo Fisher Scientific
MagAttract RNA Cell Mini M48 Kit (192)	Qiagen
QuantiFast SYBR Green RT PCR Kit	Qiagen
RNeasy micro Kit	Qiagen
RQ1 RNase-Free DNase	Promega
UltraVision Quanto Detection System AP	Thermo Fisher Scientific

3.5 Immunomagnetische Teilchen (Beads)

Dynabeads® sind superparamagnetische sehr kleine gleichförmige Polymer-Teilchen sog. Beads, die mit monoklonalen Antikörpern beschichtet sind.

Dynabeads® CD45	Invitrogen
-----------------	------------

Dynabeads® CD15	Invitrogen
Dynabeads® Epithelial Enrich (EpCAM)	Invitrogen

3.6 Antikörper

Antikörper für Immunzytologie (anti-human):

Maus-Zytokeratin (Clone MNF116)	Dako Code-Nr. M 0821
Maus-Pan-CK	Thermo Scientific MS-343-R7
Maus-Heatozyten-Ab1 (Hep Par-1)	Thermo Scientific MS-1810-R7

Primäre Antikörper (anti-human) für Immunfluoreszenzfärbung:

Maus-anti-CD45	abcam ab8216
Kaninchen-anti-CD45	abcam ab10559
Maus-anti-Pan-Keratin	Cell signaling #4545
Meerschwein-anti-Pan-CK	antibodies-online ABIN126062
Kaninchen-anti-EpCAM	abcam ab32392
Maus-anti-EpCAM	CellSignaling #2929
Kaninchen-anti-ASGPR1	abcam ab42488
Kaninchen-anti-Vimentin	Epitomics #2707-1
Kaninchen anti-N-Cadherin	Epitomics#2019-1

Sekundäre Antikörper für IF:

alle von Jackson ImmunoResearch

Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor488-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-anti-Maus Cy3-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-Anti-Kaninchen Cy3-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

Ziege-anti-Meerschwein AlexaFluor647-konjugiertes AffiniPure F(ab')₂ Fragment

Ziege-anti-Maus FITC-konjugiertes AffiniPure F(ab') Fragment

3.7 Primer

QuantiTect Primer Assay; Qiagen:

Epithelial Cell Adhesion Molecule	<i>EpCAM</i>	QT00000371
Asialoglycoproteinrezeptor 1	<i>ASGPR1</i>	QT00004116
Keratin 18	<i>KRT18</i>	QT01846327
Keratin 19	<i>KRT19</i>	QT00081137
Hepatocyte Growth Factor Activator	<i>HGFAC</i>	QT00000077
Hypoxia Inducible factor 1 α	<i>HIF1α</i>	QT00083664
Transforming Growth Factor 1 β	<i>TGFβ</i>	QT00000728
α -Fetoprotein	<i>AFP</i>	QT00085183
Adenomatous polyposis coli	<i>APC</i>	QT02407671
Insulin-like-Growth Factor		
Binding Protein 1	<i>IGFBP1</i>	QT00049427

MWG Eurofins:

β -Aktin *BACT* forward: 5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'
reverse: 5'-TCCTTAATGTACGCACGATTT-3'.

3.8 Methoden

3.8.1 HCC-Patientenblutproben

Die Blutproben von HCC-Patienten, die für das der vorgelegten Dissertationsschrift zugrundeliegende Projekt untersucht wurden, stammen aus einem gemeinsamen Forschungsprojekt mit der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Guido Gerken (Bio.NRW, Profile). Vergleichsproben, die aus der Inneren Klinik (Tumorforschung) am Westdeutschen Tumorzentrum, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. M. Schuler, stammen, wurden über einen eigenen Ethikantrag gewonnen (12-5047-BO, Uniklinikum Essen; AEKNO 2012304, Ärztekammer Nordrhein).

Die Diagnose HCC wurde in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie nach den standardisierten Kriterien gestellt. Im oben genannten Projekt wurden neben den klinischen Kriterien (AFP, typische Leber Raumforderung in Ultraschall und CT bzw. MRT) zusätzlich

biopsische Proben entnommen und im Institut für Pathologie und Neuropathologie, Direktor Univ-Prof. Dr. med. Kurt Werner Schmid untersucht.

Die Blutproben wurden peripher-venös in 4 x 10 ml Citrat-Monovetten gewonnen, bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden aufgearbeitet. Für die Negativ- und Positivkontrollen wurden je 20 ml Blut von freiwilligen Probanden ohne bekannte Malignome untersucht bzw. mit Hep G2-Zellen versetzt (Spiking-Experimente). Jede Blutprobe (4 x 10 ml) wurde als Doppelansatz verarbeitet: Je 20 ml für molekularbiologische Untersuchung und je 20 ml für morphologische Untersuchungen, wie z.B. Immunzytochemie oder Immunfluoreszenzfärbungen.

3.8.2 Isolation der PBMNC mittels Dichtegradientenzentrifugation

Für jede 20 ml Blutprobe wurde ein Leucosep-Röhrchen mit 16 ml eines Percoll-Medium-Gemisches (1:1) bzw. im Laufe der Methodenvvalidierung mit Ficoll-Paque (Dichte: 1,079g/ml) befüllt und 3 min bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend befand sich das Dichtegradientenmedium unterhalb der porösen Polyethylentrennscheibe. Je 20 ml antikoaguiertes Vollblut (Citrat-Röhrchen) wurden mit 10 ml PBS verdünnt und in ein vorbereitetes Leucosep-Röhrchen überführt. Während der Zentrifugation bei 1600 x g für 20 min ohne Bremse wurden die PBMNC und somit auch die CTC aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte von unerwünschten Erythrozyten und Granulozyten separiert und in der Interphase zwischen Plasmafraktion und Separationsmedium angereichert. Die Interphase wurde in ein 50 ml Greiner-Tube überführt und mit 50 ml Waschpuffer (PBS; 0,5% BSA) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 10 min wurde der Überstand abgesaugt und die PBMNC in 1ml Waschpuffer aufgenommen.

3.8.3 Sequentielle Anreicherung der Tumorzellen mittels Dynabeads® und King Fisher mL Magnetpartikelprozessor (Abb.7)

Die gewaschenen PBMNC-Pellets wurden in je 1 ml Waschpuffer (PBS; 0,1% BSA) suspendiert und jeweils in Position B eines King Fisher Tubes überführt. In Position A wurden 25 µl Anti-CD45 Dynabeads® und 975µl Waschpuffer pipettiert. In Position C wurden 5 µl Epithelial Enrich-Dynabeads® (EpCAM) und 995 µl Waschpuffer pipettiert. Die Position D wurde mit 1 ml Waschpuffer befüllt und in Position E wurden 500µl Waschpuffer zum Resuspendieren der EpCAM-positiven (EpCAM+) Zellen vorgelegt. Mit Hilfe des King Fisher Magnetpartikelprozessors wurden die CD45-Beads in Position A zunächst gut durchmischt, vom Magneten aufgenommen und in Position B überführt. Dort wurden die PBMNC mit CD45-Beads gut durchmischt und für 30 min inkubiert, wobei hämatopoetische Zellen an die Beads gebunden und anschließend mit dem Magneten separiert (zurück in Position A)

wurden. Somit kam es zu einer Depletion der CD45-positiven (CD45+) Zellen und folglich zu einer Voranreicherung der (bead-freien) Tumorzellen in der ursprünglichen Zellsuspension in Position B. Man spricht hierbei von einer Negativ-Selektion. Anschließend wurden die Anti-EpCAM-Beads in Position C gut durchmischt, vom Magneten aufgenommen und in Position B zu den verbleibenden Zellen überführt. Während einer 30 minütigen Inkubation wurden die EpCAM+ Zellen an die Beads gebunden. Dann wurden die bead-gebundenen Zellen vom Magneten aufgenommen, in Position D gewaschen und schließlich in Position E in Waschpuffer resuspendiert. Da es sich hierbei um eine direkte Anreicherung von EpCAM+ Zellen handelt, spricht man von einer Positiv-Selektion.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die EpCAM+ Fraktion (Position E), die CD45+ Fraktion (Position A) und die verbleibende bead-freie CD45-/EpCAM-Zellsuspension (Position B) zentrifugiert und in Lysispuffer (RLT /DTT) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Für Immunfärbungen wurden die EpCAM+, die restliche beadfreie und die CD45+ Zellsuspensionen mittels Cellspin auf Objektträger zentrifugiert, luftgetrocknet, in 96%igem Ethanol für 10 min fixiert und bis zur Untersuchung bei 4°C gelagert.

Im Rahmen der Methodenoptimierung und -validierung wurde die Negativ-Selektion etabliert, wobei CD15-Beads anstatt der EpCAM-Beads in Position C pipettiert wurden. Verschiedene Konzentrationen der CD15-Beads wurden zur Depletion der hämatopoetischen Zellen ausgetestet, so dass letztlich ein Gemisch von je 25µl CD45- und CD15-Beads zur Depletion eingesetzt wurde. Anschließend wurden von der bead-freien depletierten Zellsuspension je 2 Cellspins angefertigt, die für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet wurden.

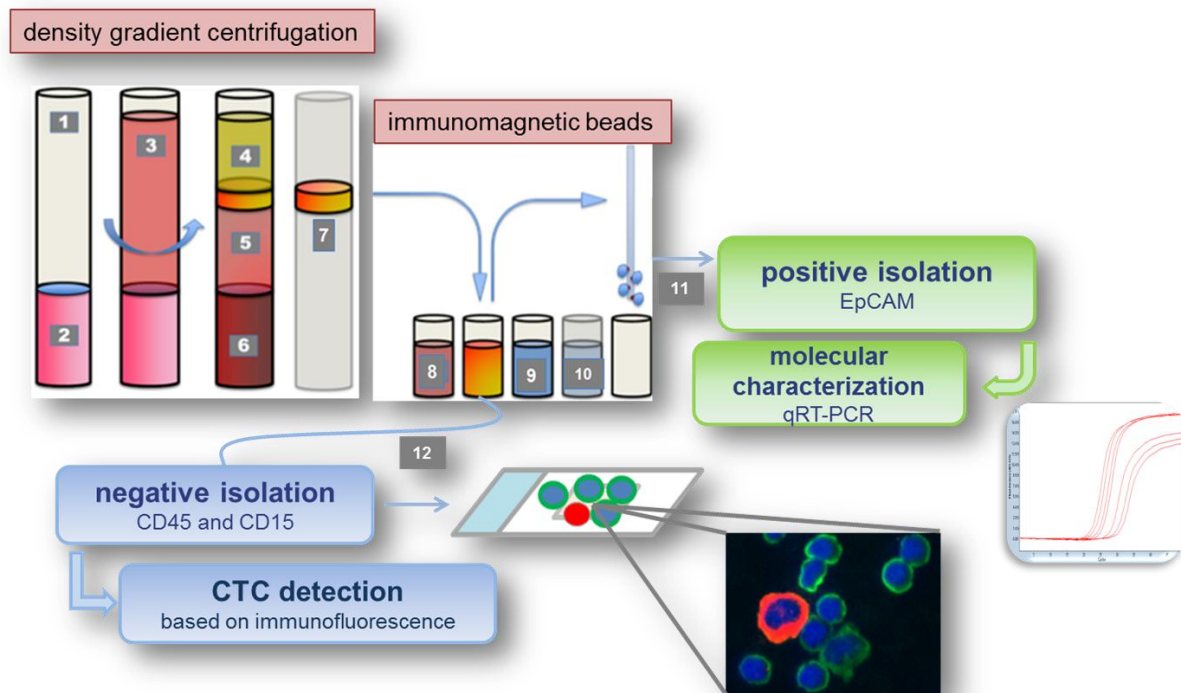


Abb.7: Schematische Darstellung des Grundprinzips der Methode. 1.Leucosep-Röhrchen; 2.Separationsmedium; 3.Vollblut/PBS-Gemisch; 4. Plasma; 5.Separationsmedium nach Zentrifugation; 6.Erythrocyten; 7.Interphase mit PBMNC incl. CTC (buffy coat); 8.CD45-Beads (Position A); 9.EpCAM-Beads (PositionC) bzw. CD15 Beads bei Negativ-Selektion; 10.Waschpuffer (Position D); 11.EpCAM-bead-gebundene CTC: vorrangig qRT-PCR, aber auch Cellspins für Immunfärbung (Position E); 12.Depletierte bead-freie Zellsuspension: Cellspin für Immunfärbung (Position B)

3.8.4 ThinPrep®- Verfahren und anschließende automatisierte Färbung gegen Pan-CK

In Vorbereitung auf das ThinPrep®-Verfahren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. med. Hideo A. Baba am Institut für Pathologie und Neuropathologie wurde die EpCAM+ bzw. CD45-/EpCAM- Zellsuspension nicht auf Objektträger zentrifugiert sondern in je 20 ml Cytolyt-Lösung bei 4°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Das ThinPrep®-Verfahren wird zur Diagnostik gynäkologischer Abstriche verwendet, aber auch zur Aufarbeitung von nicht-gynäkologischem Probenmaterial (klinische Zytologie) im Rahmen der Krebsdiagnostik. Im Institut für Pathologie wurden die Proben mittels spezieller Filtrationstechnik aufgearbeitet, wobei jeder ThinPrep®-Objektträger eine Reihe von Verarbeitungsschritten durchläuft: 1.) Dispersion: Der TransCyt®-Filter dreht sich in dem Zellmaterialbehälter und schafft eine Bewegung, die zwar stark genug ist, um die Nekrose abzuscheiden und den Schleim zu dispergieren, sich aber in keiner Weise negativ auf das Zellmaterial auswirkt. 2.) Zellsammlung: Im TransCyt®-Filter bildet sich ein niedriges Vakuum und die Zellen sammeln sich auf der Außenfläche der Filtermembran. Die Software des ThinPrep® 2000 Prozessor steuert die Zellsammlung und prüft die Durchflussgeschwindigkeit

des TransCyt®-Filters. 3.) Zellübertragung: Nach Sammlung der Zellen auf der Membran wird der TransCyt®-Filter umgedreht und leicht auf den ThinPrep®- Objektträger gedrückt. Durch die natürliche Bindekraft der Zellen und geringem Druck bleiben diese am ThinPrep®- Objektträger hängen, gleichmäßig verteilt in einem abgegrenzten Kreis. Anschließend wurden die ThinPrep®-Objektträger mit anti-human monoklonalem Maus-Zytokeratin (Clone MNF116; Code-Nr. M 0821) im „Autostainer“ von DakoCytomation immunzytochemisch gefärbt und mit Peroxidase (DAKO LSAB™+/HRP-Kit) bzw. Alkalischer Phosphatase (Dakocytomation APAAP Kit) visualisiert.

3.8.5 Nachweis Pan-CK- bzw. Hep Par-1-positiver Zellen mit alkalischer Phosphatase nach EpCAM-positiver Selektion

Der Nachweis epithelialer bzw. von der Leber abgeleiteter Zellen in der EpCAM-positiv angereicherten bead-gebundenen CTC-Suspension wurde mit dem UltraVision Quanto Detektionssystem AP (ThermoScientific) durchgeführt. Dazu wurden die Cellspin-Präparate 15 min mit Perm/Wash (BD Bioscience) permeabilisiert und anschließend in TBS Tween (LV, TA-999-TT, Verdünnung 1:20) überführt. Die Objektträger wurden in Coverplates überführt, in die Färbepank gesteckt, mit TBS befeuchtet und 5 min mit Ultra V Block (TA-060-UB) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf dem Objektträger zu besetzen und die Hintergrundfärbung zu minimieren. Anschließend wurde der Primär-Antikörper (monoklonal, Maus) Pan-CK bzw. Hep Par-1 (Thermo Scientific, MS-343-R7, MS-1810-R7 Hepatozyten-Ab1) aufgetragen und für 30 min inkubiert. Nach einem Spülschritt mit TBS wurde der Primary Antibody Amplifier (TL-125-QPB) aufgetragen und für 15 min inkubiert. Nach zwei weiteren TBS-Spülschritten wurde das mit alkalischer Phosphatase gelabelte, gegen Maus-Antikörper gerichtete Quanto AP-Polymer (TL-125-QA-L) aufgetragen und für 15 min inkubiert. Anschließend wurde mit TBS gespült und der Polymerkomplex mit dem Liquid Fast Red (LV, TA-125-AL) Substratpuffer und -Chromogen sichtbar gemacht. Nach 15 min Inkubationszeit erfolgten zwei Spülschritte mit Aqua dest. und TBS sowie die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin (TA-125-MH, Verdünnung 1:10) für 1 min. Abschließend wurden die gefärbten Präparate mit Aqua dest. gespült und an der Luft getrocknet. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Färbedurchgang ein Objektträger mit fixierten Hep G2-Zellen mitgeführt und gleichbehandelt. Die Identifizierung der positiv-gefärbten Zellen (rosa) erfolgte mit dem LeitzDialux 20 EB Mikroskop, an dessen Objektiv eine Leica DC 300F Kamera angeschlossen war.

3.8.6 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung von CTC-Subtypen nach Negativselektion

Aufgrund der paramagnetischen Dynabeads, die um die Zellen herum bzw. auf den Zellen lokalisiert sind und das Laserlicht sehr stark reflektieren bzw. streuen, ist der Nachweis

epithelialer Zellen in der bead-gebundenen EpCAM+ Fraktion mittels Immunfluoreszenzfärbung (IF) technisch nicht möglich. Daher wurde die IF der CTC und der hämatopoetischen Zellen in der negativ selektionierten bead-freien Tumorzellsuspension durchgeführt. Die Cellspin-Präparate wurden zunächst 15 min in 4% igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und 15 min in Perm/Wash permeabilisiert. Nach einem PBS-Waschschritt wurde für 30 min in Blockierungspuffer (5% BSA; 0,3% Triton-X) blockiert. Anschließend wurden die Präparate in eine feuchte Kammer gelegt, mit den entsprechenden Primär-Antikörpern (Verdünnung 1:200) wie Maus-CD45 für hämatopoetische Zellen und Meerschwein-Pan-CK, Kaninchen-ASGPR1 oder Kaninchen-EpCAM oder Kaninchen-Vimentin oder Kaninchen-N-Cadherin für CTC versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach einem 10 minütigen Waschschritt mit 0,1% Tween, wurden die entsprechenden Sekundär-Antikörper (Ziege-anti-Maus; Ziege-anti-Kaninchen und Ziege-anti-Meerschwein) aufgetragen (Verdünnung 1:200) und für 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Präparate 5 min mit 0,1% Tween gewaschen und 10 min mit DAPI (1µg/ml) im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Präparate kurz in PBS gewaschen, mit anti-fading Medium (Prolong Gold, Invitrogen) eingedeckt und im Dunkeln bei 4°C gelagert. Als Positivkontrolle wurde bei jedem Färbedurchgang je ein Objektträger mit einem Gemisch aus PBMNC (Gesundblut) und Hep G2-Zellen (100:1) für die epithelialen Marker bzw. mit GIST-Zellen für die mesenchymalen Marker mitgeführt und gleichbehandelt. Die manuelle Auswertung der Slides erfolgte mit dem digitalen Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskop (Model BIOREVO) mit integrierter Kamera und BZ-Analyser Software. Zellen, die DAPI-positiv (Kernfärbung) und Pan-CK- und/oder EpCAM- und ASGPR1- oder Vimentin- bzw. N-Cadherin-positiv und CD45-negativ waren, wurde als Tumorzellen betrachtet.

Rezepte für benötigte Puffer und Lösungen:

Perm/Wash (BD) nach Hersteller Anleitung verdünnen:

5 ml Perm/Wash

45 ml H₂O

Blockierungspuffer:

50 ml PBS

5 ml FBS (10%) bzw. alternativ 10% Milchpulver

150µl Triton X-100 (0,3%)

Antikörperverdünnungspuffer:

50 ml PBS

0,5 ml FBS (1%)

150µl Tween 20 (0,3%)

Waschpuffer:	50 ml PBS
	50 µl Tween (0,1%)
DAPI-Lösung (1µg/ml):	50 ml PBS
	50µl DAPI

3.8.7 Quantifizierung von CTC-Subtypen

Von jeder Patientenprobe wurde nebst der Positiv-Selektion wie oben beschrieben eine Negativ-Selektion angefertigt. Die verbleibende bead-freie angereicherte CTC-Suspension (1ml) wurde anschließend mittels Cellspin auf 2 Objektträger verteilt. Von diesen Präparaten wurde je einer gegen CD45/CK/Vimentin und der zweite gegen CD45/CK/N-Cadherin gefärbt, um Zellen mit mesenchymalen und auch mit epithelialen und/oder hämatologischen Eigenschaften zu detektieren. Von jedem Präparat wurden 10 Gesichtsfelder in der 20x Vergrößerung manuell mit dem Keyence BZ 9000 Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei wurden verschiedene Subtypen der CTC erfasst und quantifiziert. Anschließend wurden die jeweils erfassten Zellzahlen mit klinischen Daten korreliert.

3.8.8 RNA-Extraktion aus CTC und DNA-Verdau

Während der Methodenoptimierung wurden verschiedene kommerzielle Kits zur Extraktion der Gesamt-RNA ausgetestet, um die geeignetste Methode für die geringen Probenvolumina der CTC zu etablieren. Es wurden Silikatsäulen- und Magnetbead-basierte Methoden verglichen. RNA aus Patientenproben wurde mit dem RNeasy micro Kit (Qiagen) in Kombination mit dem Qiacube (Automatisierung der RNA Aufreinigung) bzw. händisch (Tischzentrifuge) und auch mit dem MagAttract RNA Cell Mini M48 (192) Kit (Qiagen) in Kombination mit dem King Fischer Magnetpartikelprozessor (Thermo) je nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Verdau mit dem RQ1 RNase free DNase Kit (Promega) durchgeführt. Anschließend wurde der RNA-Gehalt im Eluat sowie der Extinktionskoeffizient mittels sensitivem Spektrophotometer (Nanodrop) bestimmt. Die RNA der Proben für die molekularbiologischen Untersuchungen zur Etablierung prognostischer Marker wurde mit dem MagAttract Kit extrahiert und anschließend wie oben beschrieben mit RQ1 DNase verdaut.

3.8.9 Reverse Transkriptase quantitative Real Time –PCR (qRT-PCR)

Für die One-Step-qRT-PCR wurden QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kits (Qiagen) und QuantiTect primer assays (Qiagen) der folgenden Gene verwendet: *EpCAM*, *ASGPR1*, *KRT19*, *HGFAC*, *TGFb*, *Hif1a*, *APC*, *AFP*, *IGFBP1*. Als Housekeeping-Gen wurde Beta-Aktin (BACT; Eurofins MWG) verwendet: F: 5'-GAGCGCGGCTACAGCTT-3'.R: 5'-

TCCTTAATGTCACGCACGATTT-3'. Jede Genexpression wurde in Triplikaten mit dem Roche LightCycler 480 unter folgenden Zyklusbedingungen bestimmt: 10 min bei 50°C und 5 min bei 90°C für RT und Denaturierung. Anschließend 50 Zyklen 10 s bei 95°C und 30 s bei 60°C. Als interne Standards wurden Triplikate von Kontroll-RNAs (je 10 ng/µl) aus Hep G2-, HCT116- und A549-Zellen sowie eine Negativkontrolle (Tris-HCl) mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Genexpressionen zu gewährleisten.

3.8.10 Statistik

Der Spearman's Test für bivariate Korrelationen wurde verwendet, um Zusammenhänge zwischen CTC-Subtypen und klinischen Daten der Patienten zu untersuchen. Die Kaplan-Meier Methode wurde angewandt, um die Zusammenhänge der Verhältnisse (Ratios) der unterschiedlichen CTC-Subtypen mit dem progressionsfreien Überleben (PFS) zu untersuchen. Unterschiede im Überleben zwischen Patienten mit hohen bzw. niedrigen Zelltyp-Ratios wurden mit dem Log Rank Test analysiert.

Der Wilcoxon Test für gepaarte Proben wurde verwendet, um Genexpressionsunterschiede in den CTC-Suspensionen und den hämatologischen Fraktionen festzustellen. Die Zusammenhänge zwischen Genexpressionen und klinischen Parametern sowie zwischen den Genexpressionen untereinander wurden mit Spearman's Test für bivariate Korrelationen untersucht. Um unabhängige prognostische Faktoren zu finden, die mit dem Therapieansprechen (Progression) korrelieren, wurde jede Genexpression als kontinuierliche Variable in einem linearen multivariaten Regressionsmodell zusammen mit den bekannten klinischen Serum-Tumormarkern AFP, Bilirubin und LDH sowie dem Therapieansprechen (Progression) als abhängige Variable analysiert. Genexpressionsänderungen, die signifikant mit Therapieansprechen (Progression) korrelierten, wurden dichotomisiert, wobei der Median als Cut-Point gewählt wurde, um die Kohorte in hoch- und niedrig exprimierende Gruppen zu unterteilen. Die Receiver Operating Characteristic (ROC)-Curve Methode wurde angewendet, um die Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) der Genexpressionen an den gewählten Cut-Points für die Unterscheidung zwischen Progression und Therapieansprechen zu ermitteln.

Das Signifikanzniveau wurde auf $P < 0.05$ festgesetzt. Alle P-Werte basieren auf zweiseitigen Tests. Alle statistischen Tests wurden mit dem Software-Paket SPSS für Windows (Version 19.0; SPSS, Inc, Chicago, IL) und Medcalc, Version 12.3.0 (Mariakerke, Belgium) durchgeführt.

3.8.11 Zellkulturen:

Die humanen Karzinomzelllinien Hep G2 (Leber), HCT116 (Colon) und A549 (Lunge) wurden von der American Type Tissue Collection (ATTC) bezogen und in 75 cm² Kulturflaschen bei

37°C mit 5% CO₂ in Dulbecco's Minimum Essential Medium High Glucose mit Glutamin (DMEM) versetzt mit 10% FBS und 1% Gentamycin kultiviert. Das Medium für die Hep G2-Zellkultur wurde zusätzlich mit 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA) und 1% Natrium Pyruvat versetzt. Die GIST-Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Bauer (Innere Klinik/Tumorforschung) zur Verfügung gestellt. Die bereits gewaschenen Zellpellets wurden in PBS aufgenommen, auf Objektträger getropft und an der Luft getrocknet.

Für die Kultivierungsversuche der CTC von HCC-Patienten wurden Terasaki-Platten, Chamber-Slides, 24-well-Platten oder 35-mm-Zellkulturschalen verwendet. Die Zellkulturgefäße wurden unbeschichtet bzw. beschichtet mit Kollagen, Poly-D-Lysin, Fibronektin, Gelatine, oder Matrigel eingesetzt. Es wurden verschiedene kommerziell erhältliche bzw. für andere Karzinomzelllinien gebräuchliche Kulturmedien ausgetestet: HepatoSTIM (BD), HMM (Lonza), EpiCM (Sciencell), Ham's-F10 (mit FBS, L-Glutamin, Gentamycin, MITO, BPE) und DMEM mit 10% FBS, 1% Gentamycin, 1% Natrium Pyruvat, 1% NEAA. Von Volkmann et al. wurde ein Medium beschrieben zur Kultivierung von primären Hepatozyten und Lebergewebe (Volkmann, Fischer et al. 2007). In Anlehnung an die beschriebenen Zusätze wurde folgendes Medium zur Kultivierung der isolierten CTC hergestellt und verwendet: DMEM mit 10% FBS, 1% NEAA, 1% Natrium Pyruvat, 1% Gentamycin, Insulin (0,4 IE/ml), Hepes (20 mM), Vitamin-Lösung, L-Ornithin (20 mg/l); Ascorbinsäure (50 mg/l) und Dexamethason (8 µg/ml).

Für die Kultivierung der CTC von Patienten mit (NSCLC) wurde folgendes Medium verwendet: DMEM mit 10% FBS; 1% Gentamycin; 1% L-Glutamin; 0,1% MITO und 0,5% BPE. Die Zellen wurden sofort nach der Negativselektion mit Cisplatin (20 µg/ml) für 2 h inkubiert, anschließend gewaschen, mit frischem Kulturmedium versetzt und weitere 24 h kultiviert.

3.8.12 Senescence-Assay

Die zelluläre Seneszenz wurde mit dem kommerziellen „Cellular Senescence Assay Kit“ (Chemicon; Merck Millipore) untersucht, dem die seneszenzbedingte β-Galactosidase-Aktivität nicht mehr teilungsfähiger Zellen zugrunde liegt. Bei pH 6 wird X-Galactose durch β-Galactosidase hydrolysiert, wobei ein blaues Nebenprodukt entsteht.

4. ERGEBNISSE

4.1 Methodenetablierung zur CTC-Isolierung und -Identifizierung

4.1.1 ThinPrep®-Technik mit Pan-CK-Färbung und Visualisierung mit Peroxidase

Als Negativ-Kontrolle wurde ein Präparat, das nur Beads aber keine Zellen enthielt, mitgefärbt. Parallel wurde eine Gesundkontrolle mitgeführt, wobei Blut eines gesunden Spenders mit CD45- und EpCAM-beads behandelt wurde. Als Positiv-Kontrolle wurde gesundes Blut mit Hep G2-Zellen versetzt und gleichbehandelt. Abbildung 8 zeigt, dass die Beads die Braunfärbung der Peroxidase annehmen. In der Gesundkontrolle binden Zellen an die EpCAM-Beads, die bildmorphologisch eher avitalen Lymphozyten gleichen und ebenfalls braun gefärbt sind. Die Positiv-Kontrolle mit Hep G2 und die klinische Probe aus HCC-Patientenblut zeigen braun-gefärbte (positive) an EpCAM-bead-gebundene Zellen, die sich aber mit dieser Methode nur schwer von falsch positiven Ereignissen unterscheiden lassen. Abbildung 9 zeigt weitere Beispiele von HCC-Patientenproben, bei denen fast alle Zellen braun (positiv) gefärbt sind, wodurch eine Unterscheidung der CTC von den Beads und von falsch-positiv gefärbten Zellen kaum möglich ist.

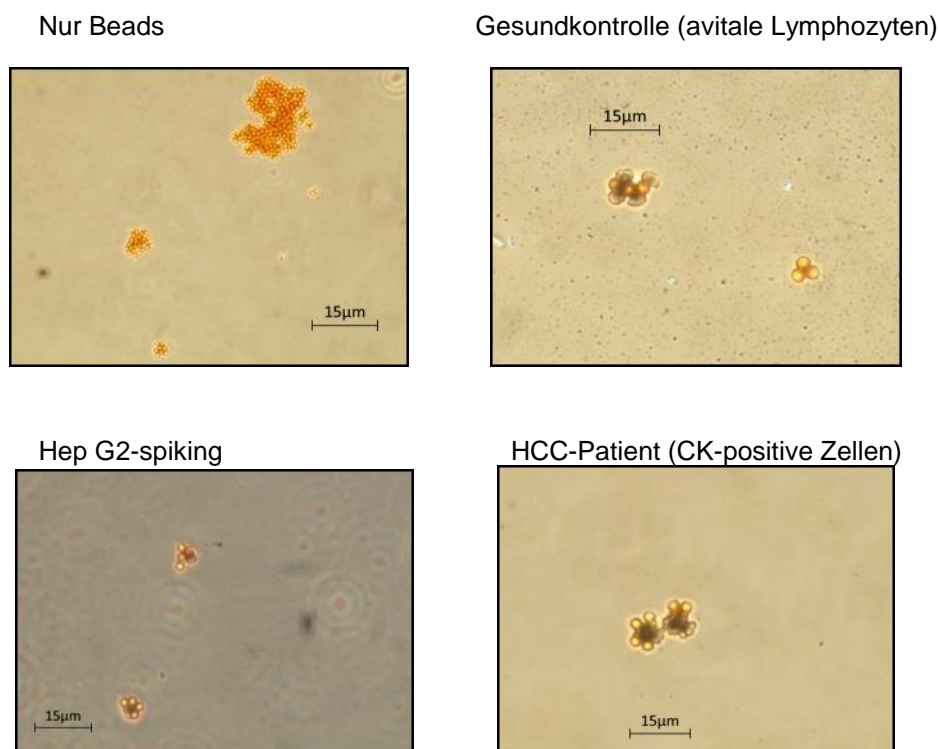


Abb. 8: Visuelle Auswertung der immunocytochemischen Färbung gegen Pan-CK (MNF-116) mit Peroxidase

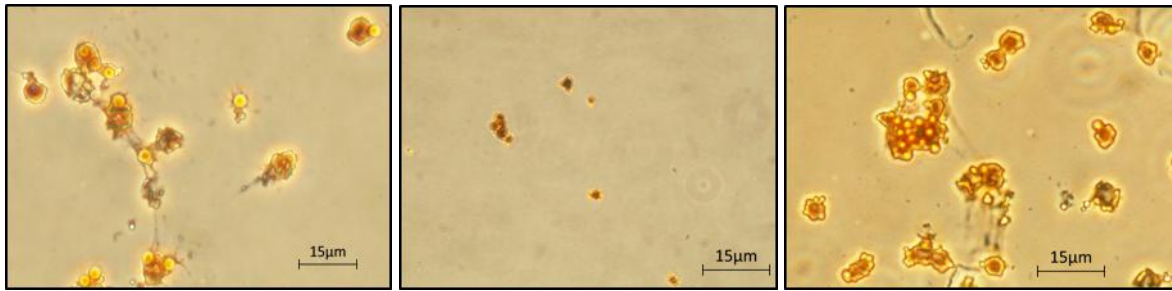


Abb. 9: Weitere Beispiele von HCC-Patienten, die mit ThinPrep-Technik® und anschließender Pan-CK-Färbung mittels Peroxidase detektiert wurden.

4.1.2 ThinPrep®-Technik mit anschließender Färbung tumorspezifischer Marker und Visualisierung mit Alkalischer Phosphatase

Um die geringe Unterscheidbarkeit zwischen epithelialen und hämatopoetischen Zellen zu verbessern, wurden zusätzlich zur Pan-CK-Färbung weitere organ-bzw. tumorspezifische Marker gefärbt und mit alkalischer Phosphatase (rosa) sichtbar gemacht. Es kam dabei jedoch ebenfalls zu unspezifischen Bindungen mit den Beads, wodurch falsch-positive Ergebnisse hervorgerufen wurden (Abb. 10).

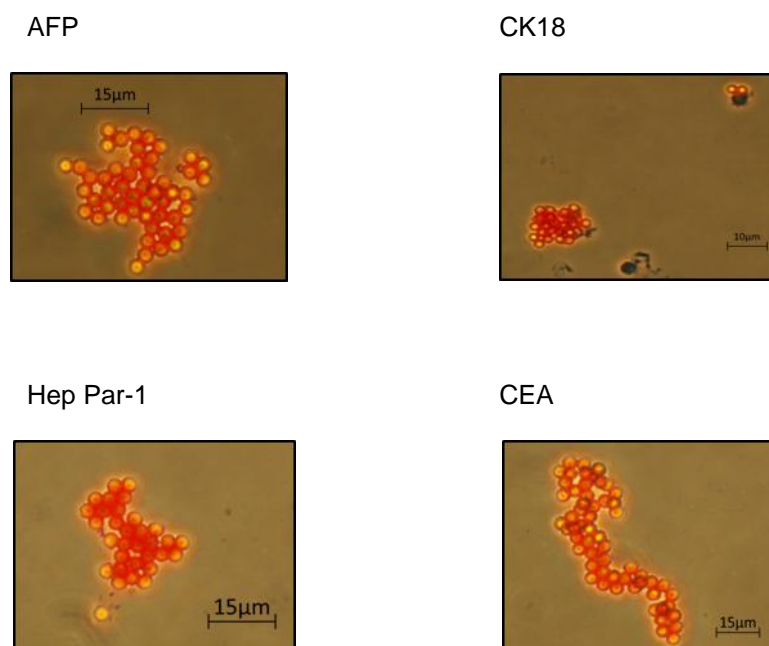


Abb.10: Immunfärbung verschiedener tumor- bzw. organspezifischer Marker mit alkalischer Phosphatase.

4.1.3 ThinPrep® und Cellspin mit anschließender Pan-CK-Färbung mit Peroxidase

Zur Überprüfung der Detektionsstärke der bisher verwendeten Ansätze wurde ein Spiking-Experiment durchgeführt, bei dem je 10 ml Vollblut eines gesunden Spenders mit je 3000 Hep G2-Zellen versetzt wurden (Doppelansatz). Anschließend wurde, wie oben beschrieben,

die Positiv-Selektion durchgeführt, wobei die Hep G2-Zellen als Surrogat für CTC dienten. Die EpCAM+ Zellsuspensionen wurden je einmal mit der ThinPrep®-Technik aufgearbeitet und einmal mit der Tharmac® Cellspin-Zentrifuge als Monolayer-Präparat auf Objektträger verbracht. Zusätzlich wurde die verbleibende CD45-/EpCAM- Fraktion mittels Cellspin auf einen Objektträger zentrifugiert. Anschließend wurden alle Präparate im Autostainer mit einem Pan-CK-Antikörper immunzytochemisch gefärbt und mit Peroxidase visualisiert. Das ThinPrep®-Verfahren zeigte sich als wenig geeignet für die EpCAM+ angereicherten Suspensionen, da es zu einem Zellverlust führte. Die Anwendung des Cellspins konnte durch Zusatz von FCR-Block optimiert werden und lieferte eine größere Anzahl von Zellen mit einer besser auswertbaren Morphologie. Dieser Versuch zeigte, dass auch in der verbleibenden CD45-/EpCAM- Zellsuspension möglicherweise Pan-CK-positive bead-ungebundene Zellen enthalten waren (Abb. 11). Es bestand jedoch weiterhin das Problem, dass aufgrund des teilweise nur graduellen Farbunterschieds zwischen CK+ und CK- eine sichere Aussage über die CK-Positivität der Zellen nur schlecht möglich war, so dass die Färbung optimiert werden musste.

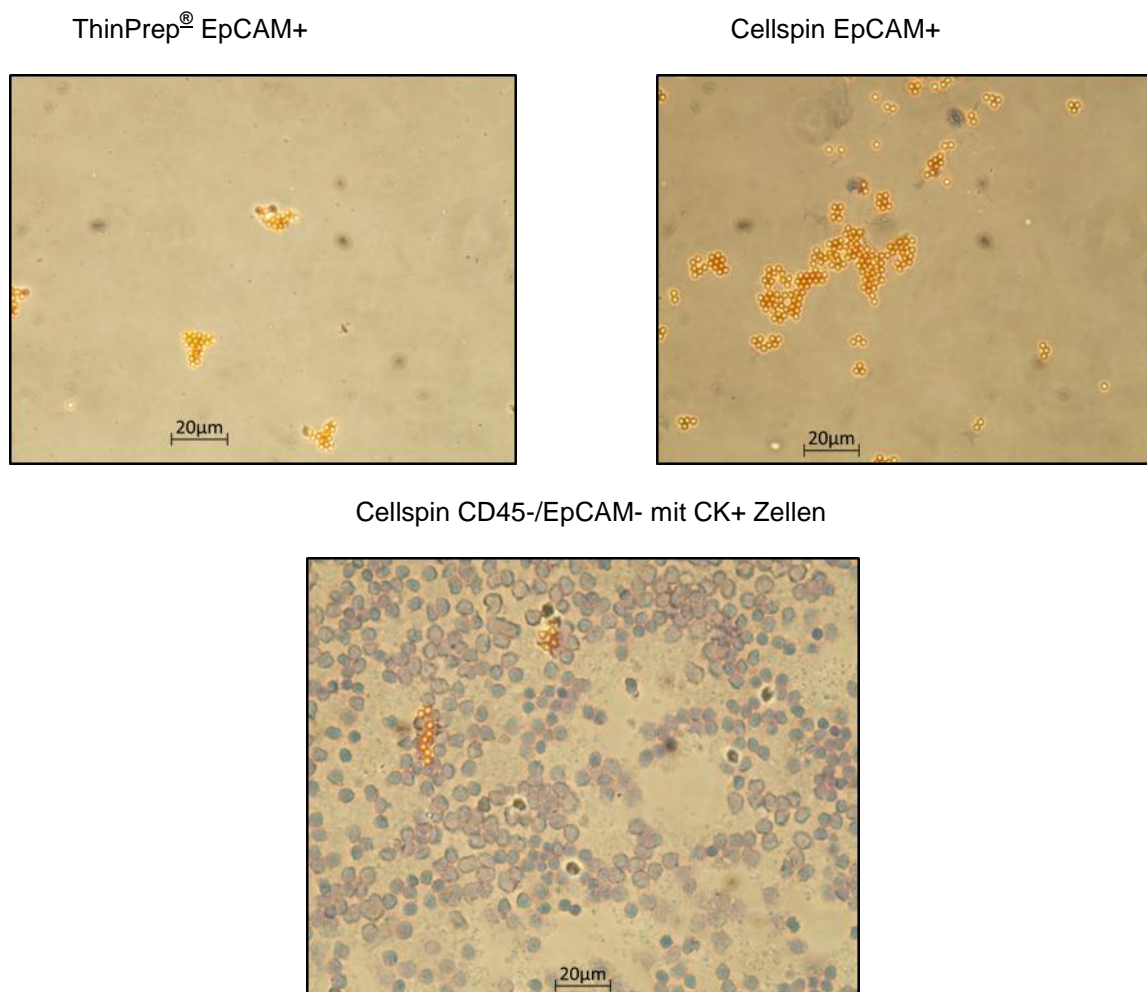


Abb. 11: Vergleich der Probenaufarbeitung mit ThinPrep® bzw. Cellspin- Technik.

4.1.4 Cellspin mit anschließender Pan-CK-Färbung mit alkalischer Phosphatase

Die bisherigen Ergebnisse ließen die ThinPrep®-Technik sowie die immunzytochemische Färbung mittels Autostainer für die CTC-Identifizierung als suboptimal erscheinen. Daher wurden die Zellsuspensionen in den weiteren Versuchen mittels Cellspin-Zentrifugation auf Objektträger gebracht und händisch gegen Pan-CK (Thermo Scientific, UltraVision Quanto Detection System AP) gefärbt sowie mit alkalischer Phosphatase visualisiert. Mit dieser Vorgehensweise konnten CK-positive Zellen sicherer detektiert und von Beads und nicht CK-positiven Zellen unterschieden werden (Abb 12).

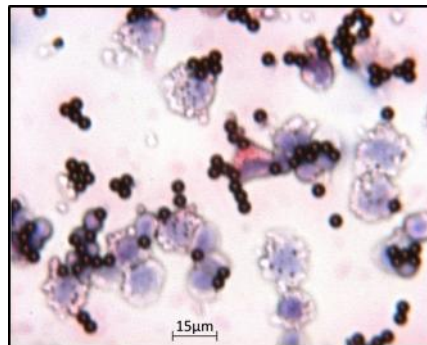
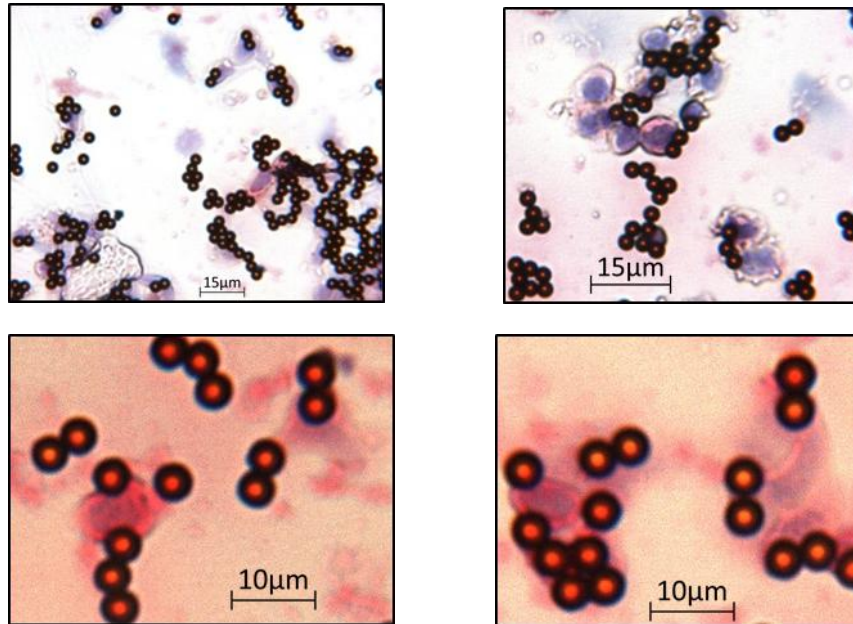


Abb. 12: Färbung einer HCC-Patientenprobe gegen Pan-CK mit alkalischer Phosphatase

4.1.5 Detektion von Pan-CK- und Hep Par-1-positiven Zellen nach sequentieller positiver Selektion mit EpCAM

Die Anreicherung von epithelialen Zellen mittels anti-EpCAM immunomagnetischen Beads wurde durch die immunzytochemische Färbung gegen Pan-CK bzw. Hep Par-1 mit alkalischer Phosphatase bestätigt. Die EpCAM-positive (bead-gebundene) angereicherte Zellsuspension von verschiedenen HCC-Patienten enthielt Pan-CK-positive bzw. Hep Par-1-positive Zellen, die von anti-EpCAM Beads umlagert waren (Abb. 13). Es ist anzunehmen, dass während der Isolierung mit dem Magnetpartikelprozessor Scherkräfte zwischen Zellen, Beads und Magnet wirkten und die Zellen in ihrer Struktur schädigten, so dass Zytoplasma austrat und so teilweise zu einer pinkfarbenen Hintergrundfärbung führte. Zusätzlich wurde die visuelle Detektion von nicht-hämatopoetischen Zellen weiterhin erschwert, da die CK- bzw. Hep Par-1-positiven Zellen von Beads um- und überlagert waren.

A)



B)

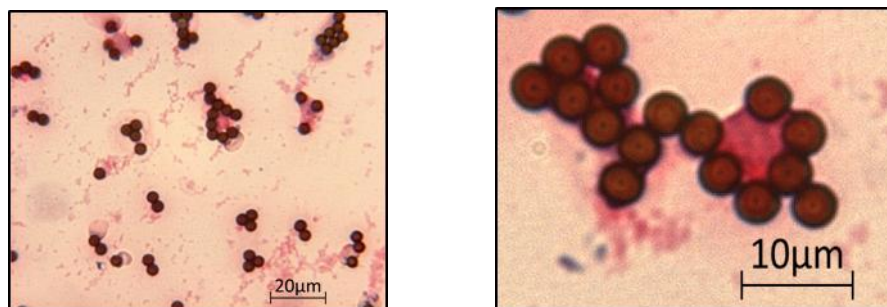


Abb. 13: A) Pan-CK positive Zellen verschiedener HCC-Proben. B) Hep Par-1-positive Zellen aus HCC-Patienten.

4.1.6 Detektion und Quantifizierung von CK-positiven Zellen nach Negativ-Selektion

Nach Positiv-Isolierung mit Dynabeads® liegen die CTC Bead-gebunden vor, wodurch eine visuelle Detektion zwar möglich ist, aber keine automatisierte Auswertung bzw. Quantifizierung (Abb.14).

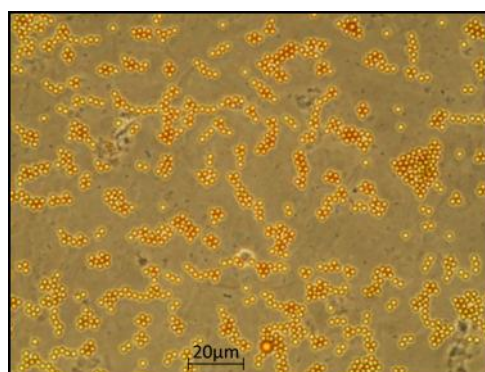


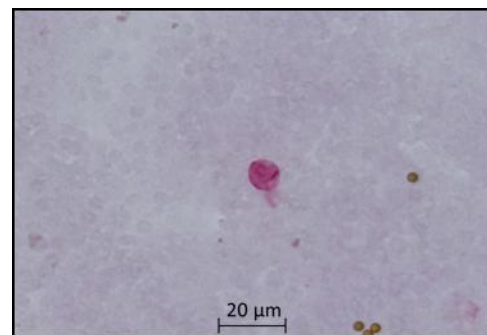
Abb. 14: Die Sequentielle Anreicherung mittels EpCAM-Beads liefert eine zellarme Suspension CK-positiver Zellen.

Nach negativer Isolierung mittels CD45-Beads wurden die Zellsuspensionen mit dem Cellspin II auf Objektträger zentrifugiert und anschließend in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Sabine Kasimir-Bauer (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe) gegen Pan-CK immungefärbt und mit alkalischer Phosphatase (Neufuchsin rot) visualisiert. Die Auswertung der gefärbten Objektträger erfolgte mit dem automatisierten Scanning Mikroskop und Imaging System Ariol SL-50 (Applied Imaging). Die Evaluierung der Zellen erfolgte nach Farbe, Form und Intensität der Färbung. Diese automatisierte Methode ermöglichte die Bestimmung der Wiederfindungsrate von Tumorzellen aus peripherem Blut mittels Spiking-Experimenten und kultivierten Karzinomzellen als CTC Surrogat (Tabelle 3). Abbildung 15 zeigt Ergebnisse der Messung von gespikten kultivierten Zellen als Positivkontrolle sowie von CK-positiven Zellen aus Blut von HCC-Patienten, die mittels manueller Mikroskopie und Ariol-System untersucht wurden (Pan-CK-Färbung mit alkalischer Phosphatase).

A) Gespikte HCT116-Zellen aus Blut isoliert; Cytospin; Mikroskop. Auswertung



B) Gespikte HCT116-Zellen aus Blut isoliert; Cytospin;Automatisierte Auswertung mit Ariol



C) HCT116-Zellkultur (Positiv-Kontrolle)



D) HCC-Patient

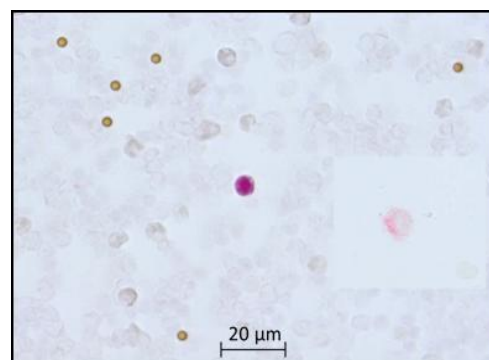


Abb. 15: Detektion von HCT116 Zellen aus Gesundblut (Spiking-Experiment) mittels **A)** Mikroskop vs **B)** Ariol-System **C)** Postivkontrolle: Färbung von HCT116 Zellen gegen Pan-CK mit alkalischer Phosphatase **D)** Detektion von CTC aus HCC-Patienten mittels Ariol nach Färbung gegen Pan-CK mit alkalischer Phosphatase.

Anfangs wurde der Dichtegradient mit Percoll, DMEM (1:1) und 2M-HCL Lösung angemischt. Die Spiking-Experimente zeigten, dass der Dichtegradient mit Ficoll gleiche Anreicherungsergebnisse liefert. Die Anreicherung zugesetzter Tumorzellen in der

Interphase (PBMNC-Schicht) während der Dichtegradientenzentrifugation führte in beiden Fällen zu einer vollständigen Wiederfindung. Die Methode wurde auf Ficoll umgestellt, da auf den Mischungsschritt verzichtet und somit eine mögliche Fehlerquelle eliminiert werden konnte. In weiteren Versuchen wurde die Wiederfindung nach negativer Anreicherung der zugesetzten Karzinomzellen bestimmt. Die CD45-Depletion nach Percoll/Medium- bzw. nach Ficoll-Dichtegradient lieferte eine Wiederfindung von 42 respektive 44%.

Sample	Dichtegradient	Isolation mit Beads	Wiederfindung
10 ml Vollblut + 100 HCT116 Zellen	Percoll/Medium	keine	100%
	Ficoll	keine	100%
	Percoll/Medium	Depletion mit CD45	42%
	Ficoll	Depletion mit CD45	44%

Tabelle 3: Wiederfindungsraten.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate mittels in Vollblut versetzter kultivierter Zellen bietet einen Anhaltspunkt bei der Überprüfung der unterschiedlichen Methodiken, ist jedoch nicht direkt vergleichbar mit der Anreicherung von CTC, da deren Eigenschaften, wie z.B. Wachstums- und Adhäsionsverhalten sich vermutlich deutlich von kultivierten Zellen unterscheiden.

Die Depletion mit anti-CD45-Beads führte zu einer Anreicherung CK-positiver Zellen. Es konnten jedoch auch CK-negative Zellen mit sehr unterschiedlicher Morphologie in der Zellsuspension nachgewiesen werden, die nicht an Beads gebunden waren. Um die Depletionsrate zu erhöhen wurden weitere gegen hämatopoetische Oberflächenantigene gerichtete Immunobeads in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen eingesetzt. Dazu wurden die PBMNC nach der Dichtegradientenzentrifugation mittels eines automatischen Cellcounters (Countess; Invitrogen) gezählt. Anschließend wurde mit verschiedenen CD45/CD15 Bead-Konzentrationen im KingFisher Magnetpartikelprozessor depletiert und die PBMNC wurden erneut ausgezählt. Der Einsatz von je 25µl CD45 und CD15-Beads führte zu einer Depletion von 73% und je 50µl beider Bead-Sorten führten zu einer 95%igen Depletion.

4.1.7 CTC-Detektion mittels Immunfluoreszenzfärbung

Aufgrund der Beobachtung der recht hohen Menge an CK-negativen Zellen mit unterschiedlicher Morphologie wurde die Detektionsmethode auf eine Immunfluoreszenzfärbung erweitert. Die Immunfärbung mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern bietet den Vorteil, dass mehrere Marker gleichzeitig gefärbt werden können. So kann z.B. die Immunfärbung des Leukozytenmarkers CD45 und des epithelienspezifischen Pan-CK gleichzeitig mit der DAPI-Kernfärbung erfolgen. In der positiv

angereicherten CTC-Suspension ist die Detektion mittels IF ungeeignet, weil epitheliale Zellen an Beads gebunden und von solchen umlagert sind, wodurch das Laserlicht stark reflektiert bzw. gestreut wird. Somit ist eine visuelle Auswertung kaum möglich (Abb.16).

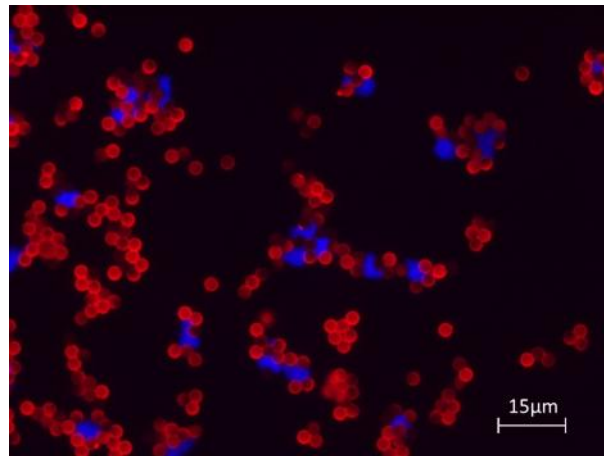


Abb. 16: IF gegen Pan-CK (rot) und DAPI (blau) einer HCC-Patientenprobe nach positiver Isolation mit anti-EpCAM Beads

Methodenoptimierung der Immunfluoreszenzfärbung: Die immunfluoreszenzbasierte Detektion wurde zunächst an Positivkontrollen, bestehend aus Hep G2-Zellen bzw. aus Gemischen von PBMNC gesunder Spender mit Hep G2-Zellen (100:1), etabliert. Für die Fixierung und Permeabilisierung wurden Methanol bzw. Paraformaldehyd (PFA) und Perm/Wash ausgetestet. Beide Methoden erwiesen sich als geeignet. Bei der Fixierung mit PFA blieb die Zellstruktur etwas besser erhalten. Für die weiteren Färbungen wurde PFA benutzt. Außerdem wurde die Verwendung verschiedener Blockierungspuffer (10% FBS; 20% FBS; 5% Ziegenserum; 5% BSA; 15% Milchkpulver) getestet, wobei keine wesentlichen Unterschiede feststellbar waren. Es wurden die Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper ausgetestet (Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800), Isotypenkontrollen durchgeführt, vergleichbare Belichtungszeiten festgelegt und verschiedene Kombinationen der Primär- und Sekundär-Antikörper untersucht. Eine Verdünnung von 1:200 für die Primär- und Sekundär-Antikörper zeigte sich als am besten geeignet. Die für die CTC-Detektion verwendeten Antikörperfunkombinationen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Primär-AK (Spezies)	Sekundär-AK	Pseudofarbe Mikroskop
Anti-CD45 (mouse)	Anti-Maus Cy3 Fab'2	Grün
Anti-Pan-CK (guinea pig)	Anti-Meerschwein Alexa Fluor 647 Fab'2	Rot
Anti-EpCAM (rabbit)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Fab'2	Gelb
Anti-ASGPR1 (rabbit)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Fab'2	Rot
Anti-Vimentin (rabbit)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Fab'2	Gelb
Anti-N-Cadherin (rabbit)	Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 Fab'2	Gelb

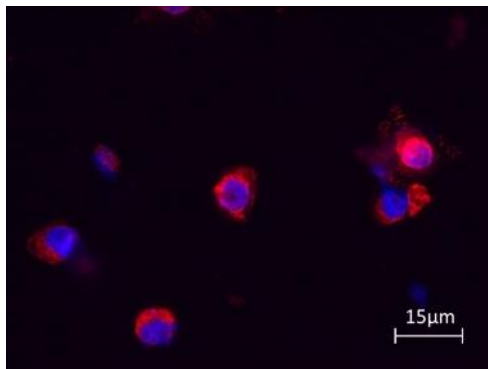
Die DAPI-Kernfärbung wurde stets mit der Pseudofarbe Blau dargestellt.

Tabelle 4: Antikörperkombinationen und Pseudofarben der einzelnen Marker.

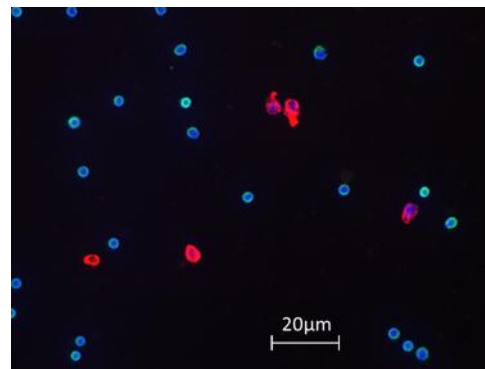
4.1.8 Detektion von CK+/CD45- und EpCAM+/CD45- sowie ASGPR1+/CD45- Zellen nach Negativ-Selektion mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die Detektion der CTC mittels IF erfolgte nach negativer Selektion in der verbleibenden bead-freien Zellsuspension. Die gefärbten Objektträger wurden manuell mit dem Keyence BZ9000-Mikroskop untersucht. Zellen, die CD45-negativ und Pan-CK-oder EpCAM oder ASGPR1-positiv waren und auch eine positive DAPI-Kernfärbung zeigten, wurden als CTC ausgewertet und deren Verteilung jeweils erfasst. Als positive Kontrolle wurde bei jeder Färbung ein Gemisch aus PBMNC und Hep G2-Zellen mitgeführt (Abb.17). Abbildung 18 zeigt beispielhaft den Nachweis einer Pan-CK+/CD45- Zelle aus einer HCC-Patientenprobe, Abbildung 19 die Detektion von EpCAM+/CD45- und ASGPR1+/CD45- Zellen.

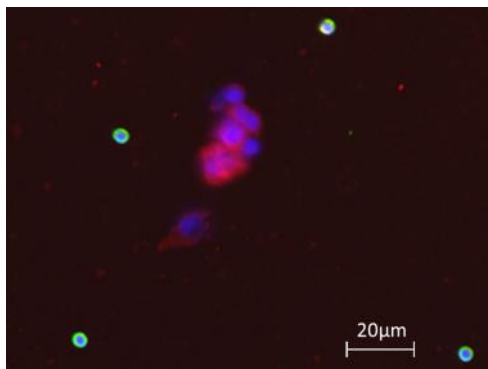
A) Kontrolle: CK+/CD45- Hep G2 Zellen



B) Positiv-Kontrolle:
HepG2(CK+)/PBMNC(CD45+)



C) Positiv-Kontrolle:
Hep G2 (ASGPR1+)/PBMNC(CD45+)



D) Positiv Kontrolle:
Hep G2 (EpCAM+)/PBMNC (CD45+)

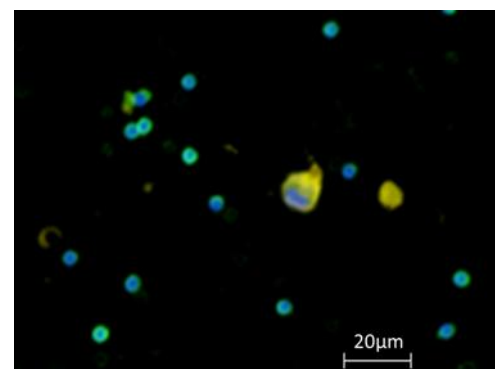


Abb. 17: **A)** IF von Hep G2 Zellen gegen Pan-CK (rot) und DAPI (blau). **B-D)** IF von HepG2/PBMNC-Gemischen gegen CD45 (grün) und DAPI (blau) sowie **B)** Pan-CK (rot), **C)** ASGPR1 (rot) und **D)** EpCAM (gelb).

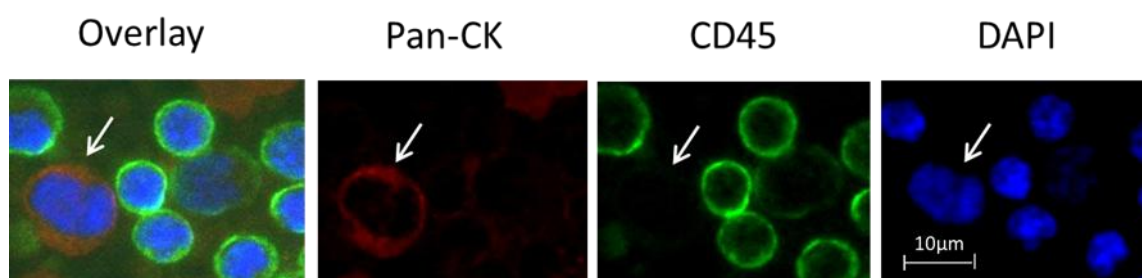


Abb. 18: Detektion einer CK+/CD45- Zelle mittels IF einer HCC Patientenprobe nach Negativ-Selektion gegen CD45, Pan-CK und DAPI

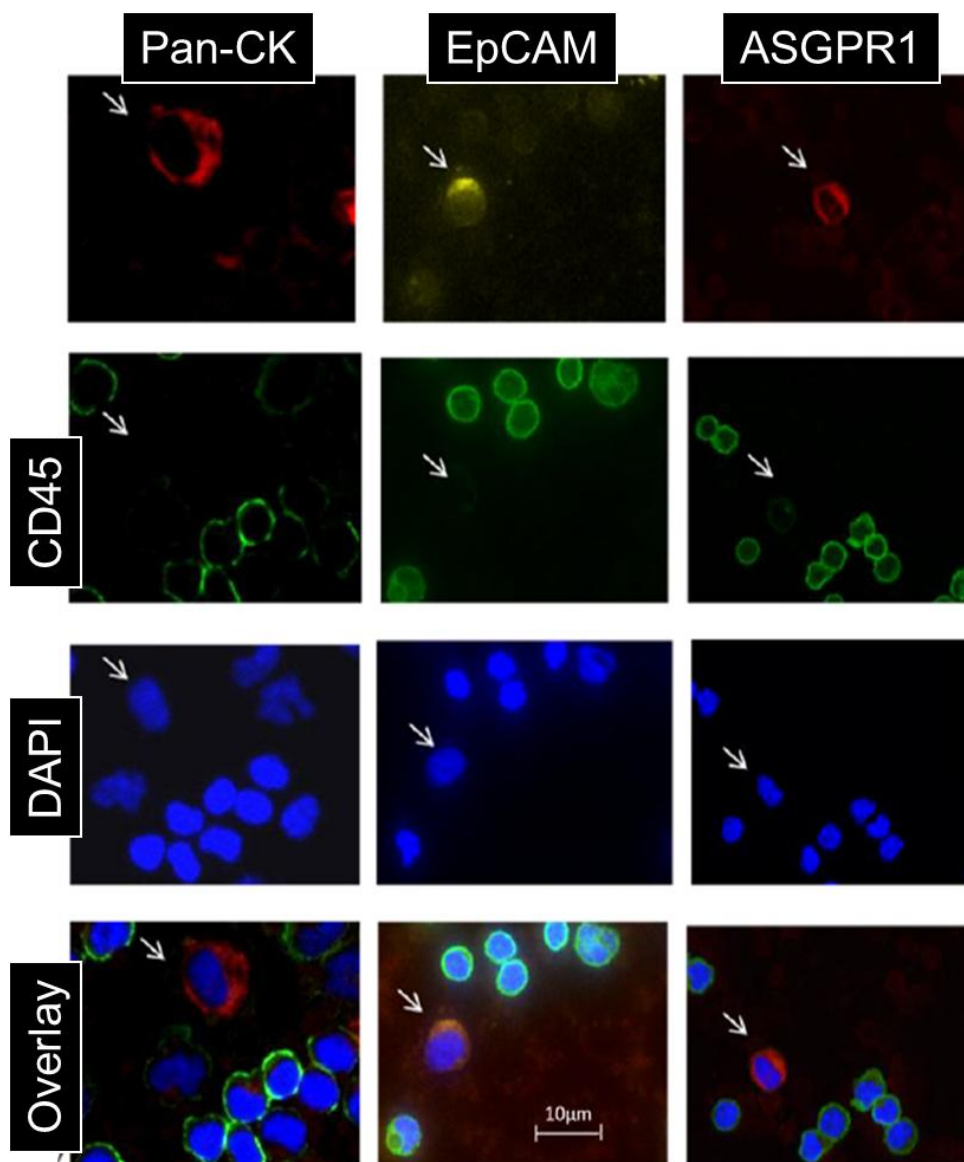


Abb. 19: IF von HCC-Patientenproben nach Negativ-Selektion gegen CD45, DAPI und Pan-CK oder EpCAM bzw. ASGPR1

4.2 Charakterisierung von CTC-Subpopulationen

Darstellung epithelialer Marker

4.2.1 Detektion von CK+/EpCAM+ und CK+/EpCAM- Zellen mittels IF

Es konnten sowohl CK+/CD45-/EpCAM+ als auch CK+/CD45-/EpCAM- Zellen in HCC-Patientenproben identifiziert werden (Abb.20).

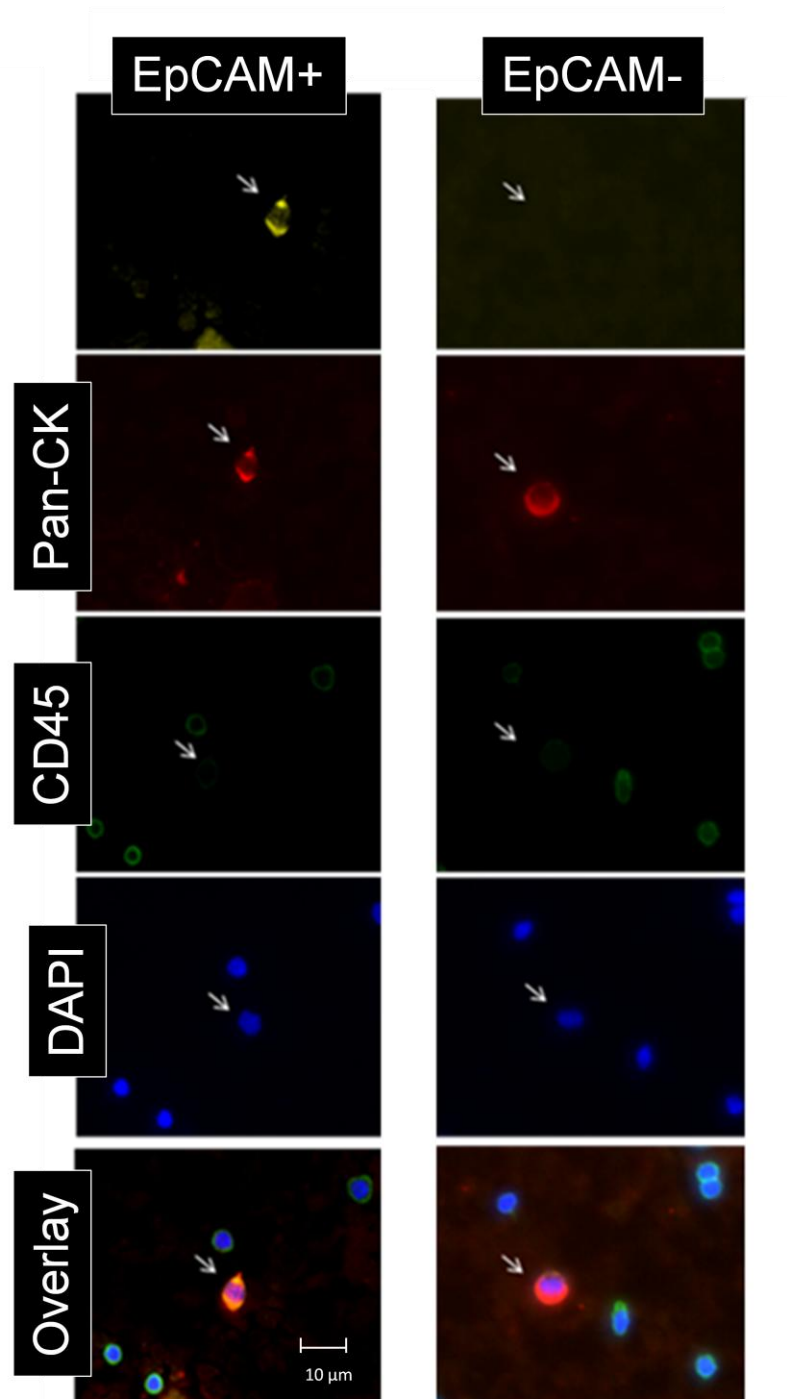


Abb. 20: IF gegen Pan-CK, EpCAM, CD45 und DAPI einer HCC-Patientenprobe nach Negativ-Selektion an verschiedenen Stellen desselben Objektträgers.

4.2.2 Detektion von EpCAM-/ CK+/CD45+ und EpCAM+/CK+/CD45+ Zellen mittels IF

Es konnten weiterhin Zellen identifiziert werden, die sowohl mit epithelialen als auch hämatopoetischen Antikörpern anfärbbar waren. So konnten CD45+/CK+/EpCAM+ und CD45+/CK+/EpCAM- Zellen detektiert werden (Abb.21).

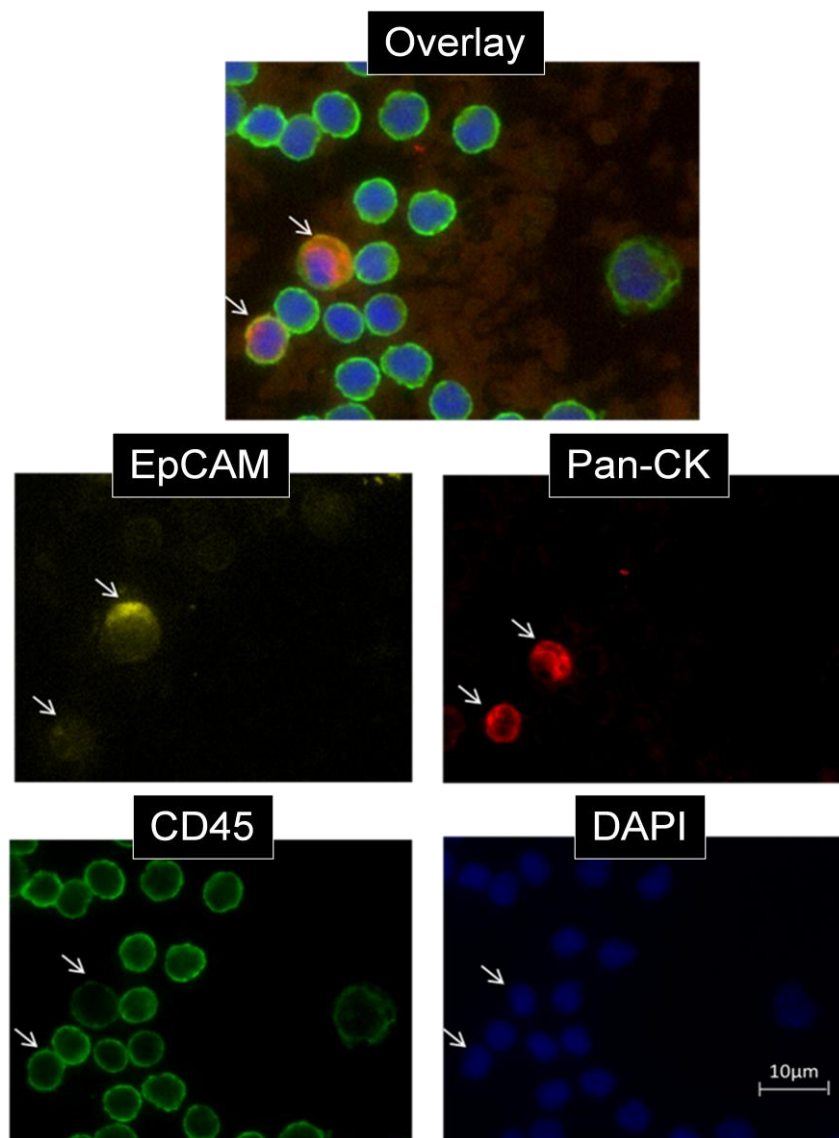


Abb. 21: IF einer HCC-Patientenprobe nach Negativ-Selektion gegen Pan-CK, EpCAM, CD45 und DAPI

4.2.3 Detektion von CK+/CD45+ Zellen unterschiedlicher Größe und Intensität

Die umfänglichen morphologischen Untersuchungen unterschiedlicher Zelltypen in mehreren Patientenproben offenbarte inter- und intraindividuell ein stark heterogenes Bild. So konnten

innerhalb derselben Patientenprobe deutliche Größenunterschiede und Signalintensitäten der verschiedenen Marker gemessen werden (Abb. 22).

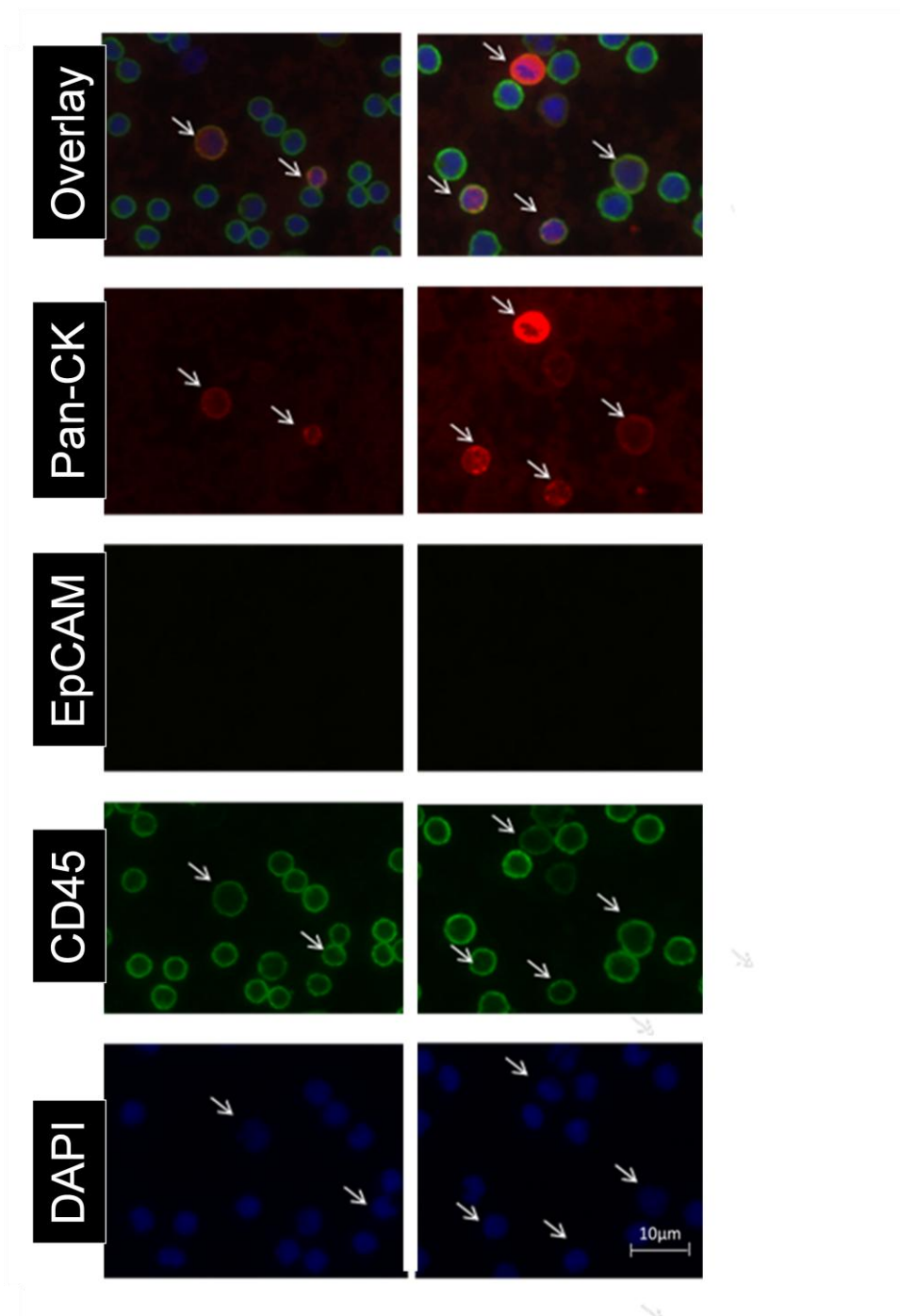


Abb.22: IF einer HCC-Patientenprobe nach Negativ-Selektion gegen Pan-CK, EpCAM, CD45 und DAPI mit unterschiedlichen Zellgrößen und Signalintensitäten.

Darstellung mesenchymaler Marker

4.2.4 Detektion von N-Cadherin+/CK+/CD45- und Vimentin+/CK+/CD45- Zellen

Zur Darstellung mesenchymaler Marker wurden zunächst kultivierte Zellen eines Gastrointestinalen Stromatumors (GIST) als Kontrollen mittels IF gegen Vimentin und N-Cadherin in Kombination mit CK und CD45 gefärbt (Abb. 23). GIST Zellen waren Vimentin-

positiv, N-Cadherin-positiv sowie CK- und CD45-negativ. Anschließend wurden HCC-Patientenproben gefärbt und es konnten Zellen mit epithelialen und mesenchymalen (CK+/Vimentin+/CD45- und CK+/N-Cadherin+/CD45-) bzw. nur epithelialen (CK+/CD45-) Eigenschaften sowie mesenchymalen/epithelialen und hämatologischen (CK+/Vimentin+/CD45+ und CK+/N-Cadherin+/CD45+) Merkmalen detektiert werden (Abb.24).

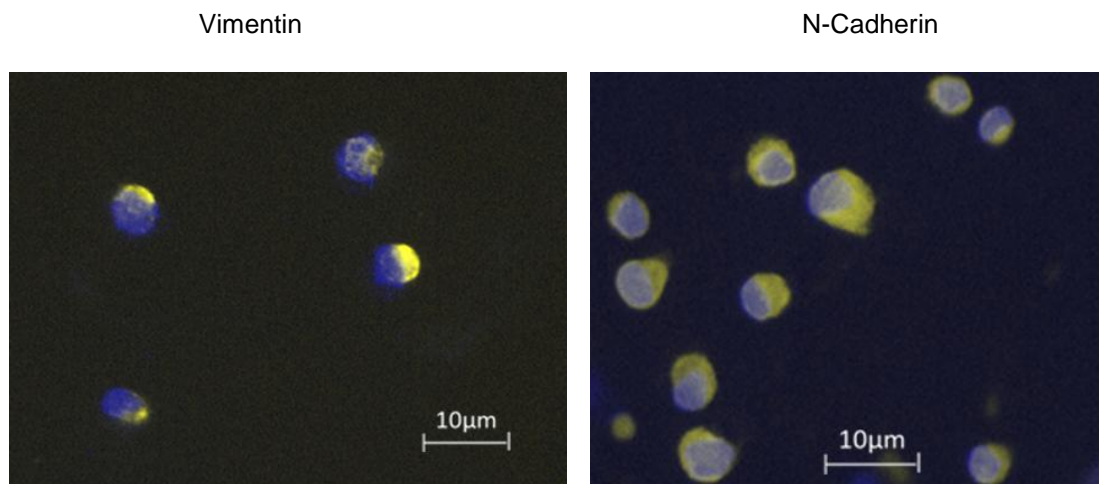


Abb. 23: Positiv-Kontrollen von GIST-Zellen

4.2.5 Quantifizierung und Korrelation mit klinischen Daten

Da das Immunfluoreszenz-basierte Vorgehen im Vergleich zu den anderen ausgetesteten Methoden hinsichtlich einer näheren Charakterisierung und Erfassung der unterschiedlichen CTC-Typen überlegen war, wurde dieses Verfahren angewendet, um die Zelltypen zu identifizieren, zu charakterisieren und mit den klinischen Daten zu korrelieren. Zu diesem Zweck wurde von jeder Patientenprobe eine CD45/CD15 depletierte Zellfraktion angelegt. Diese CTC-angereicherte Zellsuspension wurde auf 2 Objektträger verteilt, die beide IF-gefärbt wurden. Anschließend wurden die verschiedenen Subgruppen zirkulierender Zellen ausgezählt und eine Ratio der epithelialen und mesenchymalen CTC gebildet (Abb.25).

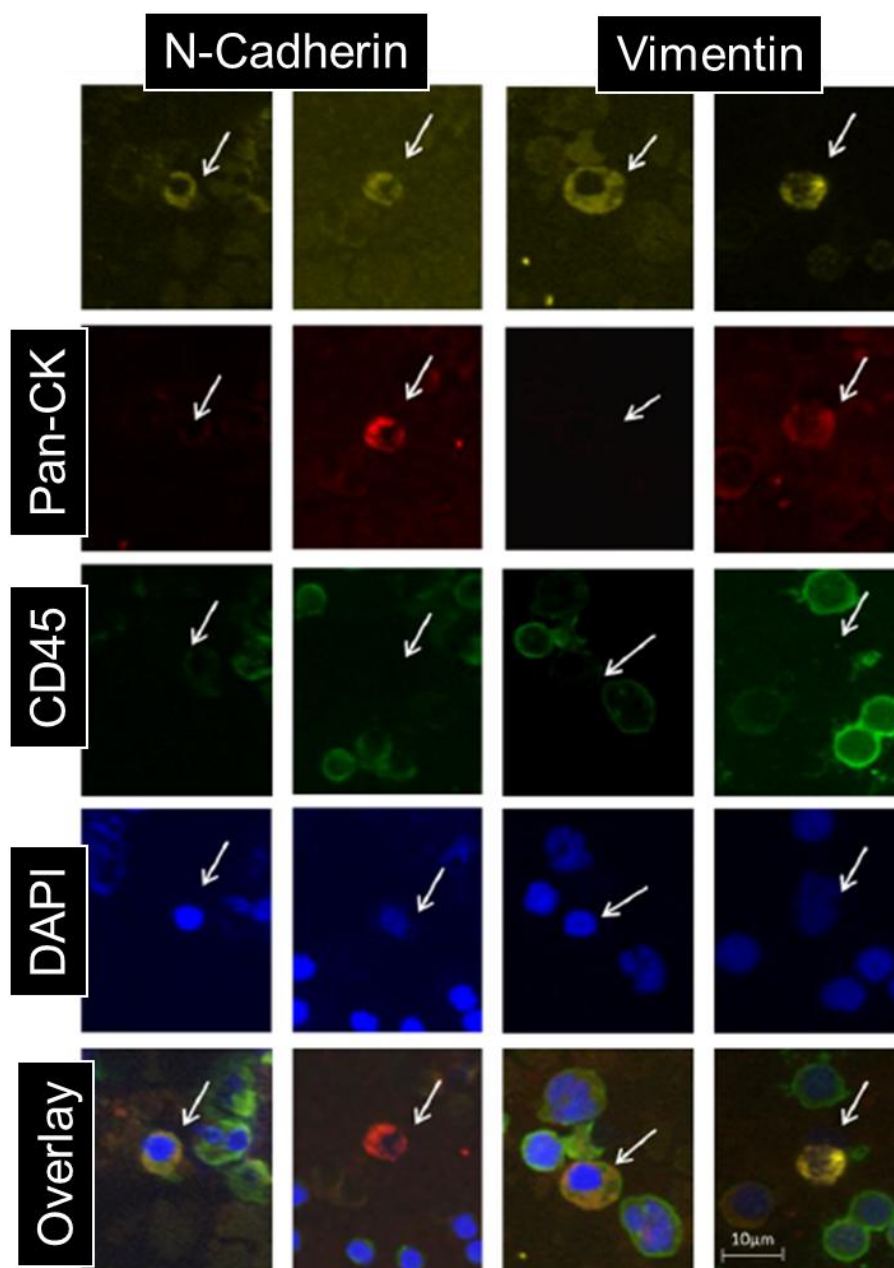


Abb. 24: Darstellung verschiedener CTC-Subtypen mittels IF von HCC-Patientenproben nach Negativ-Selektion gegen Pan-CK, CD45 ,DAPI und N-Cadherin bzw Vimentin.

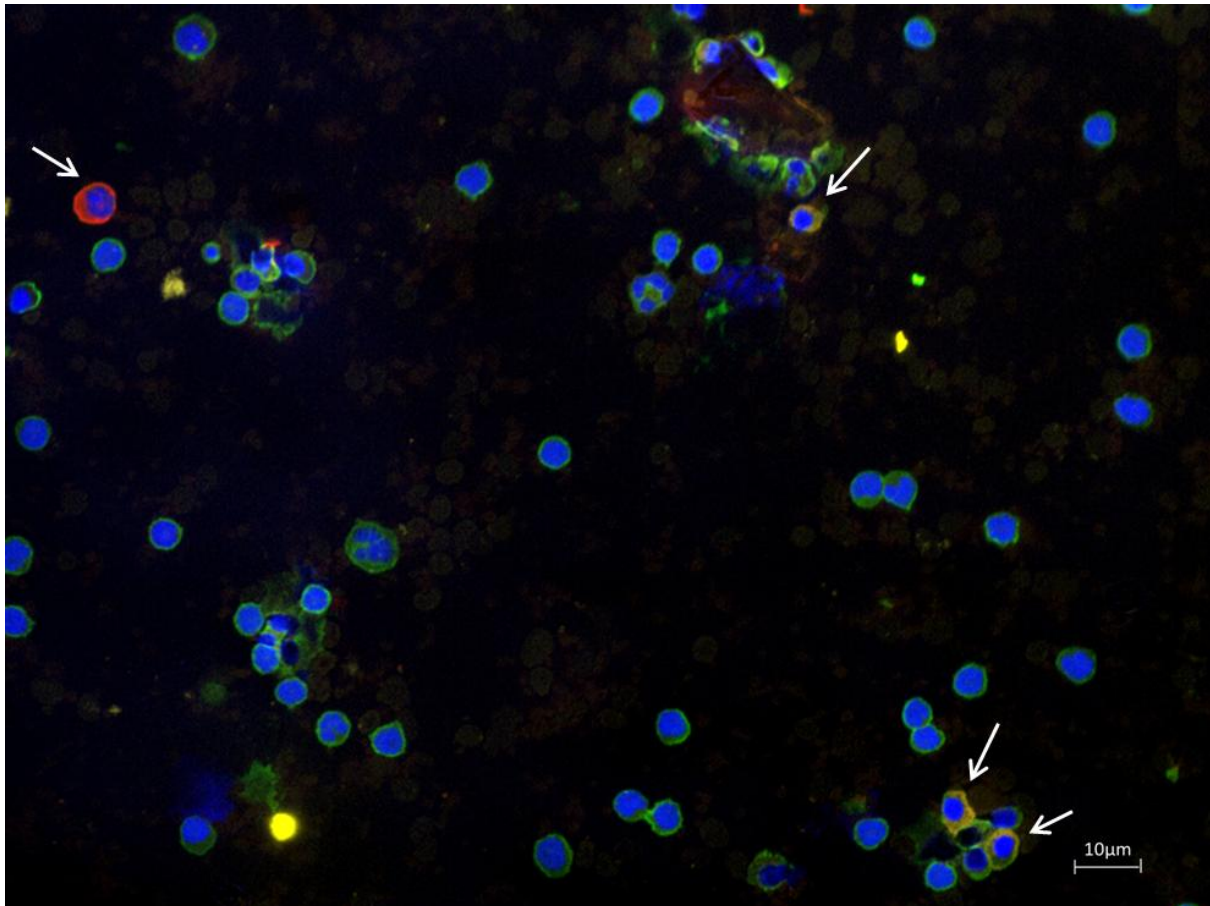


Abb. 25: Gesichtsfeld mit einem beispielhaften morphologischen Profil eines Patienten mit 1 epithelialen und 3 mesenchymalen CTC.

Um eine durchführbare Methode der manuellen fluoreszenzgestützten Auswertung zu etablieren, wurde die Vergleichbarkeit zweier gefärbter Objektträger einer Patientenprobe in mehreren Gesichtsfeldern überprüft. Dazu wurden auf beiden Slides die CK-positiven Zellen an je 5 Positionen in 5 verschiedenen Bereichen ausgezählt und die Mittelwerte gebildet (Tabelle 5).

	Slide 1	Slide 2
Zellen/5 Positionen	10	9
	14	7
	9	15
	15	12
	13	12
Mittelwert	12,2	11
Standardabweichung	2,32	2,79

Tabelle 5: Vergleichbarkeit der zwei verschiedenen Objektträger einer Probe.

4.2.6 Spearman's Korrelation der quantifizierten CTC mit klinischen Daten

Für eine erste Korrelation der Subtypen zirkulierender Zellen in Bezug zu klinischen Daten wurden 11 Patienten mit einem HCC, die in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie behandelt und im Rahmen des Bio.NRW Projektes untersucht wurden, ausgewertet (Tabelle 6).

Demographische Merkmale der Patienten		
Merkmal	Patients (n=11)	
	No.	%
Tumorgröße (mm)		
Median	49	
Streuung	30-170	
Child Status		
A	9	82
B	2	18
Zirrhose	7	64
Chronische virale Hepatitisinfektion		
HBV	2	18
HCV	4	36
Alter (Jahre)		
Median	70	
Streuung	42-85	
Therapie		
Beobachtung/Abwarten	3	27
SIRT	5	45
TACE	1	9
Resektion	1	9
Nexavar	1	9
Ansprechen		
SD	4	36
PD	4	36
TTP (Monate)		
Median	3	
Streuung	0-19	
Abkürzungen: SD, Stabilisierung (stable disease); PD, Progression (progressive disease); SIRT, Selektive Interne Radiotherapie; TACE, Transarterielle Chemoembolisation TTP, Zeitraum bis zur Progression (time to progression)		

Tabelle 6: Klinische Daten der Patienten für CTC-Quantifizierung

Die Gesamtzahl der CK-positiven Zellen in dieser Patientengruppe zeigte einen Trend zur signifikanten Korrelation mit dem Child-Status ($p=0,1215$; Abb. 26). Die Anzahl der CK-positiven CTC in Zusammenhang mit verschiedenen Therapien ist in Abbildung 27 dargestellt.

Desweiteren konnte mittels Spearman's Korrelation ein signifikanter Zusammenhang der Tumorgröße mit dem Tumoransprechen ($p=0,0274$) bzw. ein Trend zur Signifikanz mit der Ratio N-Cadherin+/CK+ ($p=0,1482$) gezeigt werden. Die Zeit bis zur Progression (TTP) war signifikant mit der Ratio N-Cadherin+/CK+ ($p=0,0457$; Abb. 28) und der Ratio Vimentin+/CK+ ($p=0,0208$) korreliert. Beide Ratios korrelierten miteinander, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ($p=0,0704$).

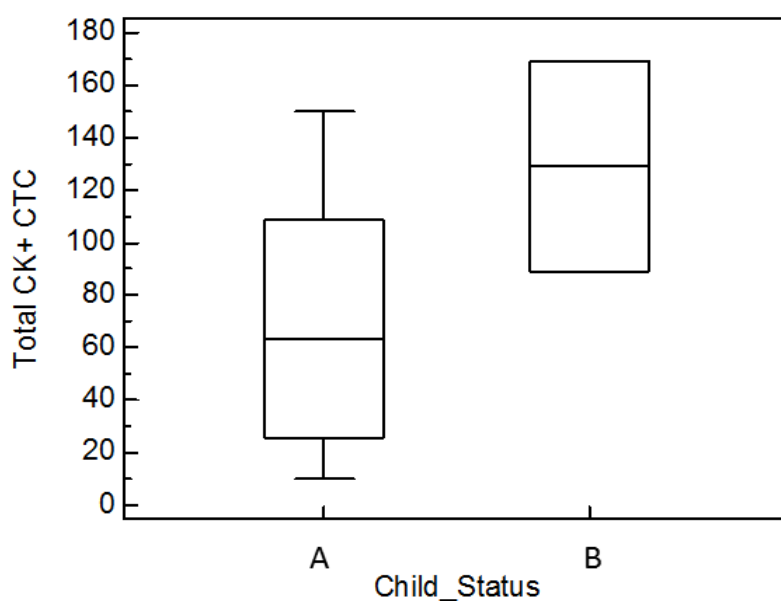


Abb. 26: Gesamt CK+ Zellen in Assoziation zum Child-Status.

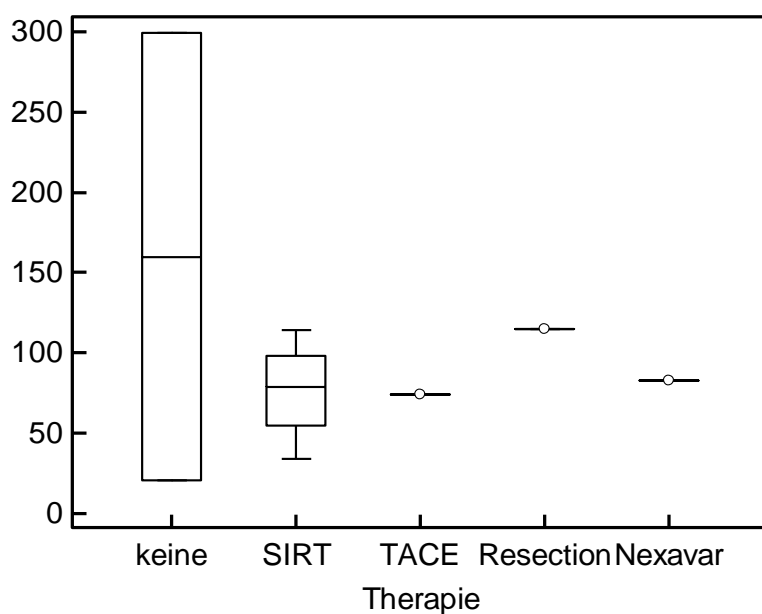


Abb. 27: Gesamt CK+ Zellen nach verschiedenen Therapien.

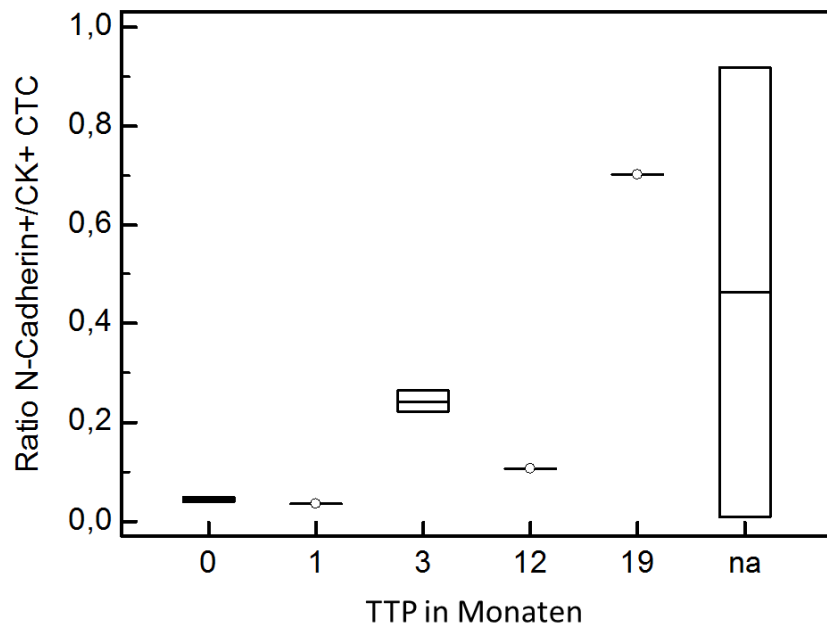
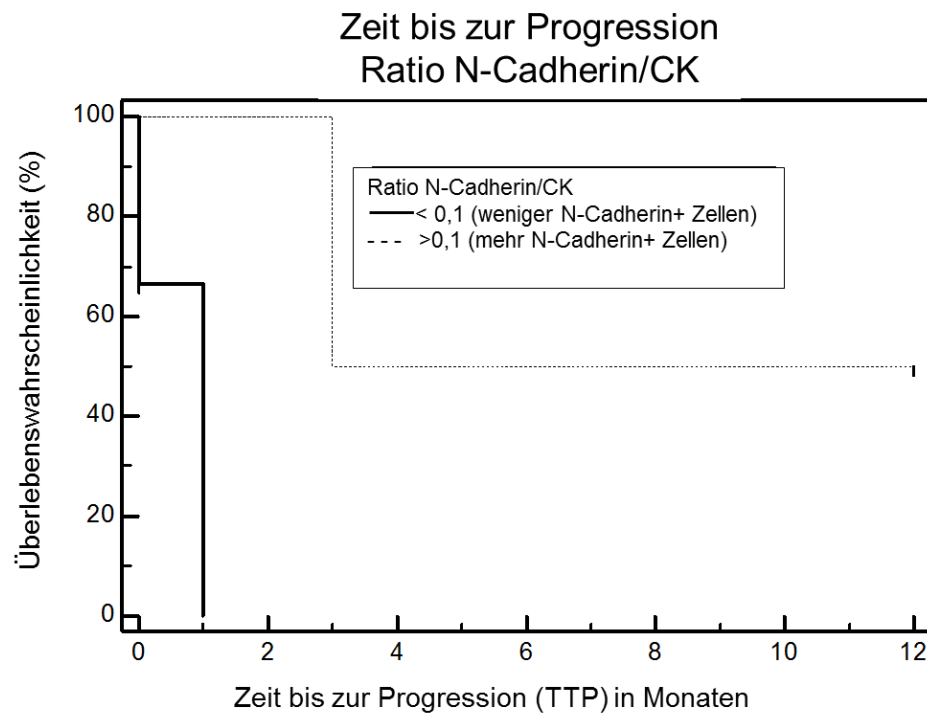


Abb. 28: Ratio N-Cadherin+/CK+ Zellen in Korrelation zum Zeitraum bis zur Progression (TTP).

4.2.7. Kaplan-Meier Log Rank Test

Da der Spearman's Rangkorrelationskoeffizient einen Zusammenhang der epithelial zu mesenchymalen Zellratio zur TTP zeigte, wurde dies mittels Kaplan-Meier Methode hinsichtlich der Signifikanz überprüft. Beide Ratios waren signifikant mit der TTP korreliert. Eine N-Cadherin+/CK+ Ratio $< 0,1$ zeigte eine Assoziation mit verkürzter TTP (12 Monate; $p=0,03$; [HR]=0,19; Abb. 29 A). Eine Vimentin+/CK+ Ratio $> 0,5$ war mit einer längeren medianen TTP (1 vs 3 Monate, $p=0,01$; [HR]=0,18; Abb.29 B) assoziiert.

A)



B)

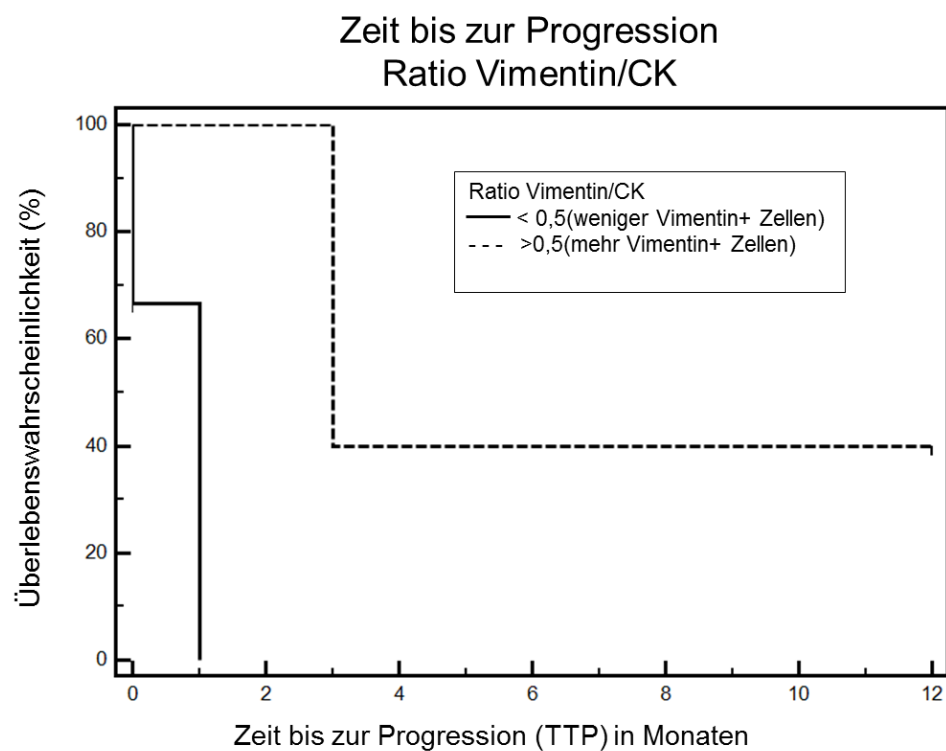


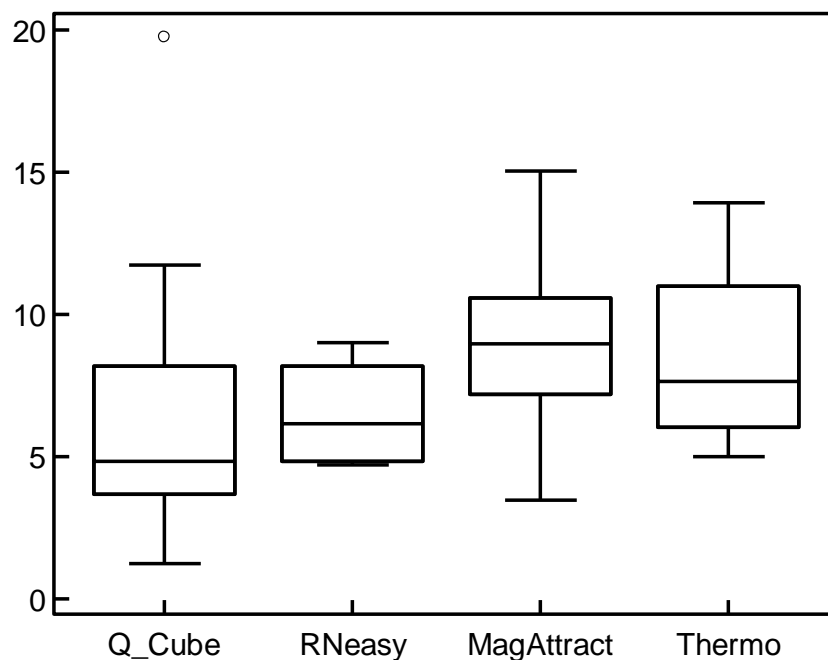
Abb. 29: Zusammenhang zwischen hoher bzw. niedriger Zelltyp-Ratio mit TTP mittels Kaplan-Meier Log Rank Test. A) N-Cadherin/CK ($p=0,03$; [HR]=0,19); B) Vimentin/CK ($p=0,02$; [HR]=0,19).

4.3 Molekulare Charakterisierung von CTC

4.3.1 Testen verschiedener RNA-Extraktionsmethoden

Es wurden verschiedene Methoden zur RNA-Extraktion aus den sehr kleinen Zellmengen getestet. Die Anwendung des Magnetbead-basierten MagAttract-Kits (Qiagen) in Kombination mit dem Magnetpartikelprozessor King Fisher (Thermo) lieferte dabei die Eluate mit den höchsten RNA-Konzentrationen von durchschnittlich $8,74 \pm 2,90$ ng/ μ l und einem Gesamt-RNA-Gehalt von $873,64 \pm 290,12$ ng/100 μ l Elutionsvolumen. Die Anwendung des Silikatsäulen-basierten RNeasy Microkits mit dem Qiacube und auch händisch (mit Tischzentrifuge) führte zwar zu ähnlich hohen RNA-Konzentrationen, bei jedoch sehr viel geringeren Elutionsvolumina von 12-15 μ l. Das RNA-Total-Kit von Thermo lieferte ähnlich hohe Gesamt-RNA-Gehalte, die letztendlich patientenabhängig sind (Abb 30). Daher wurde auch die Reinheit der extrahierten RNA-Eluate untersucht und die Extinktionskoeffizienten ($A_{260/280}$) verglichen. Dabei traten Probleme mit dem Elutionspuffer von Thermo auf, die die Reinheit ($A_{260/280}$) der RNA beeinträchtigten (Tabelle 7). Aufgrund dieser Austestung wurde für die RNA-Extraktion das MagAttract-Kit ausgewählt.

A)



B)

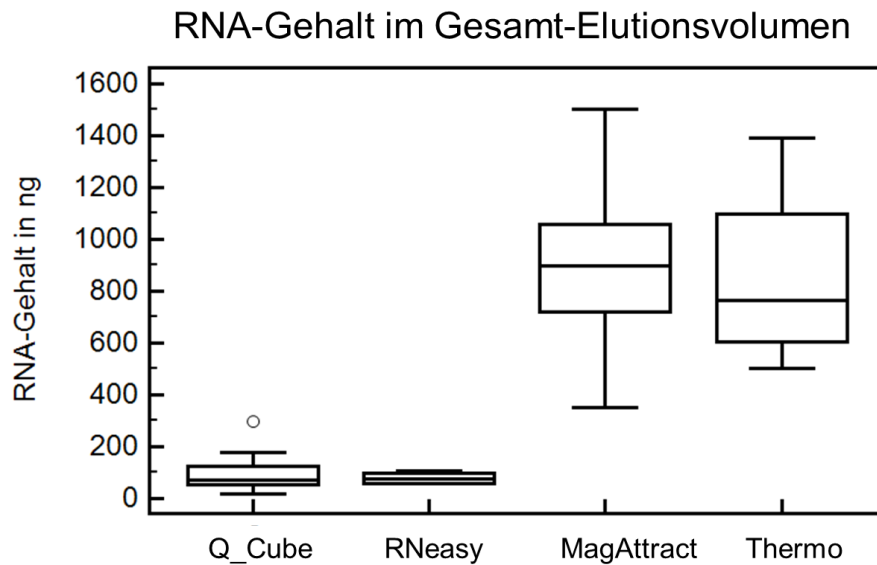


Abb. 30: Ergebnisse verschiedener RNA-Extraktionsmethoden. A) RNA-Konzentration in ng/μl. B) Gesamt-RNA-Gehalt in ng bezogen auf das Gesamt-Elutionsvolumen.

Kit	RNA-Gehalt (ng/μl)*	Elutionsvolumen (μl)	RNA-Gehalt im Elutionsvolumen (ng/μl)*	A _{260/280} *
RNeasy_Micro_Qiacube	6,46±4,15	12	96,97±62,29	2,17±0,97
RNeasy händisch	6,50±1,77	15	78,00±21,28	1,76±0,24
MagAttract_KingFisher	8,74±2,90	100	873,64±290,12	1,94±0,46
Thermo_KingFisher	8,38±2,73	100	838,36±273,46	1,72±0,22

Tabelle 7: Vergleich verschiedener RNA-Extraktionsmethoden

4.3.2 Nachweis der CTC-Anreicherung

Bestimmung des Plateau-Bereichs der Primer

Um die Eignung der kommerziell erwerblichen Primer und des SYBR-Green-RT-PCR-Kits (Qiagen) zur Detektion sehr geringer Transkriptmengen aus den aus Vollblut angereicherten Zellen zu evaluieren, wurden die Primer zunächst in Verdünnungsreihen mit RNA aus Hep

G2-Zellen getestet (Tabelle 8). Die Steigung der Ct-Werte mit abnehmender Konzentration ist in Abbildung 31 dargestellt. Als interner Standard wurde stets Beta-Aktin von Kontroll-RNA aus Hep G2-, HCT116- und A549-Zellen mitbestimmt (je 10ng/μl), um die Vergleichbarkeit verschiedener PCR-Platten zu überprüfen (Abb. 31).

Gen	Ct-Wert Plateau
<i>BACT</i>	30,5
<i>EpCAM</i>	32,1
<i>KRT18</i>	28,13 (Plateau noch nicht erreicht)

Tabelle 8: Feststellung des Plateau-Bereichs der einzelnen Primer mit Referenz-RNA aus Zellkulturen (Hep G2) in abnehmender Konzentration

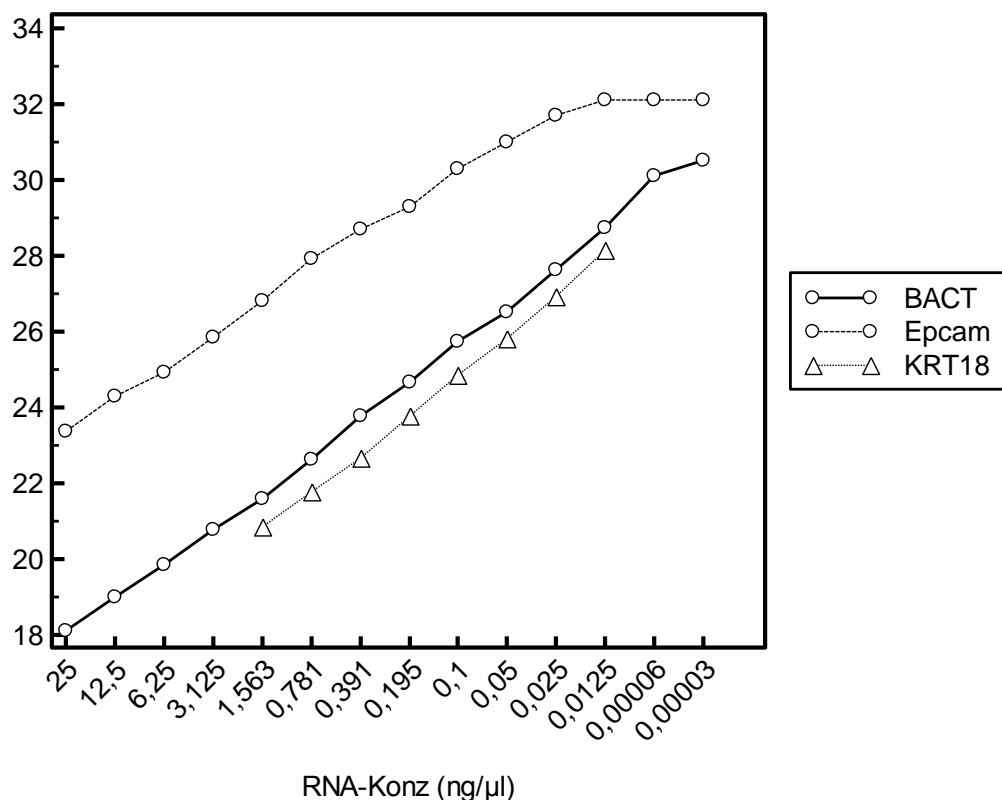


Abb. 31: Anstieg der Ct-Werte bei sinkender RNA-Konzentration.

Der Vorteil der Detektion mit SYBR-Green gegenüber Sonden-basierten Verfahren ist die hohe Sensitivität. Ein Nachteil ist allerdings die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Um die Detektion von Primer-Dimeren auszuschließen, wurde die Bildung spezifischer PCR-Produkte in der o.g. Konzentrationsreihe mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch

entstehende Primer-Dimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments. Abbildungen 32 und 33 zeigen die Schmelzkurven der spezifischen PCR-Produkte der einzelnen Primer in der Verdünnungsreihe, wobei die Schmelztemperatur gleich bleibt (spezifisches Produkt) und die Peak-Höhe abnimmt.

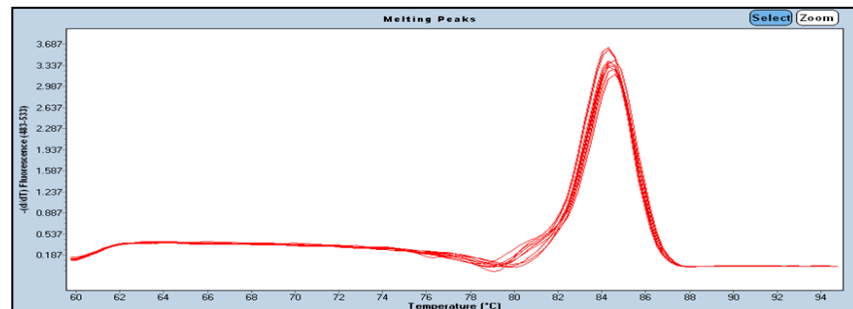
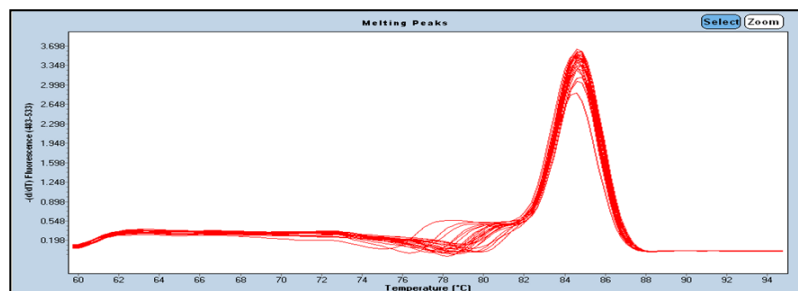
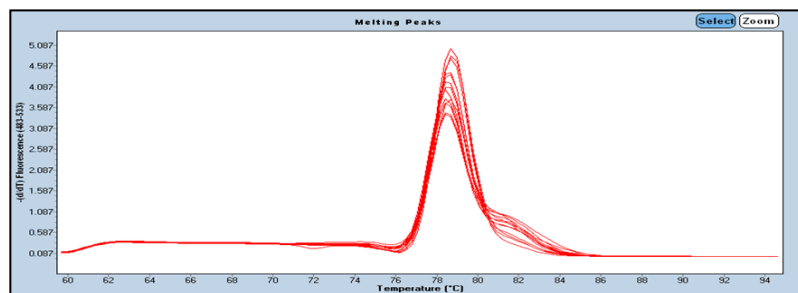


Abb. 32: BACT Schmelzkurven der internen Standards bestehend aus Triplikaten von HepG2-, HCT116-, A549-RNA (10ng/μl)

BACT



EpCAM



KRT18

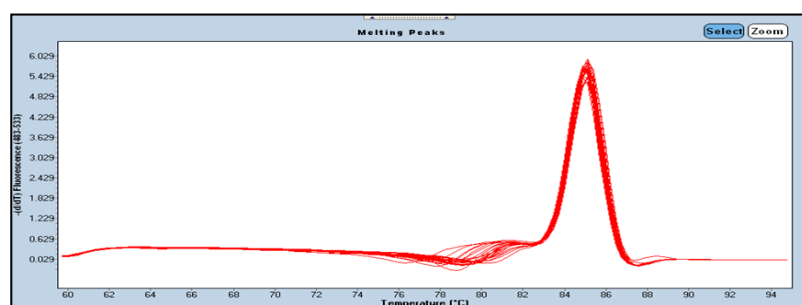
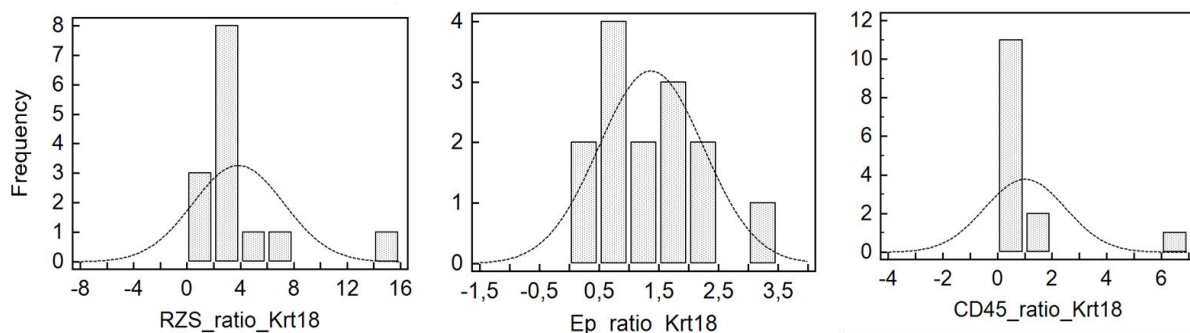


Abb 33: Schmelzkurven der PCR-Produkte mittels Primer BACT, EpCAM und KRT18 in je 2μl HepG2-RNA in einer Konzentrationsreihe von 1,5-0,0125 ng/μl.

EpCAM- und *KRT18* mRNA-Expression in depletierten und angereicherten Zellsuspensionen

Um den Anreicherungsschritt mittels anti-CD45- und -EpCAM-Beads auf molekularer Ebene nachzuweisen, wurden die mRNA Expressionen der epithelialen Marker *EpCAM* und *KRT18* mittels qRT-PCR in der depletierten CD45-positiven, in der angereicherten EpCAM-positiven und auch in der verbleibenden bead-freien Zellsuspension gemessen. Proben, deren Ct-Wert bereits im Plateau-Bereich der Primer lag, wurden nicht berücksichtigt, so dass 14 von 20 Proben in die Auswertung einbezogen werden konnten. Als Referenz wurde das Housekeeping-Gen Beta-Aktin mitgemessen, die Differenz ΔCt und anschließend die Ratio der Genexpression gebildet $2^{-\Delta Ct}$. Mittels Histogrammen konnte eine Normal-Verteilung der Proben ausgeschlossen werden (Abb. 34). Der Log-Rank-Sum Test nach Wilcoxon für gepaarte Proben zeigte eine signifikant höhere *EpCAM*-mRNA-Expression ($p=0,014$) in der angereicherten Fraktion der EpCAM-Bead-gebundenen Zellen im Vergleich zur depletierten CD45-Fraktion der hämatopoetischen Zellen. Die *EpCAM*-Expression in der verbleibenden bead-freien Zellsuspension wich von der Expression in der CD45-Fraktion ab, jedoch nicht signifikant ($p=0,105$). Diese Ergebnisse unterstützen gemeinsam mit den immunzytochemischen Versuchen eine spezifische Depletion der hämatologischen Zellen. Die *KRT18*-mRNA-Expression war in den EpCAM-Bead-gebundenen Zellsuspensionen signifikant ($p=0,029$) höher als in der CD45-Fraktion, wodurch ebenfalls die Anreicherung epithelialer Zellen in der EpCAM-Bead-Fraktion bestätigt wurde. Die *KRT18*-Expression war jedoch, verglichen mit der EpCAM-positiven Fraktion, in der verbleibenden bead-freien Zellsuspension signifikant erhöht ($p=0,0085$). Dieses Ergebnis unterstreicht auf molekularer Ebene den bildhaften immunzytochemischen Nachweis der EpCAM-negativen/CK-positiven CTC (Abb. 35).



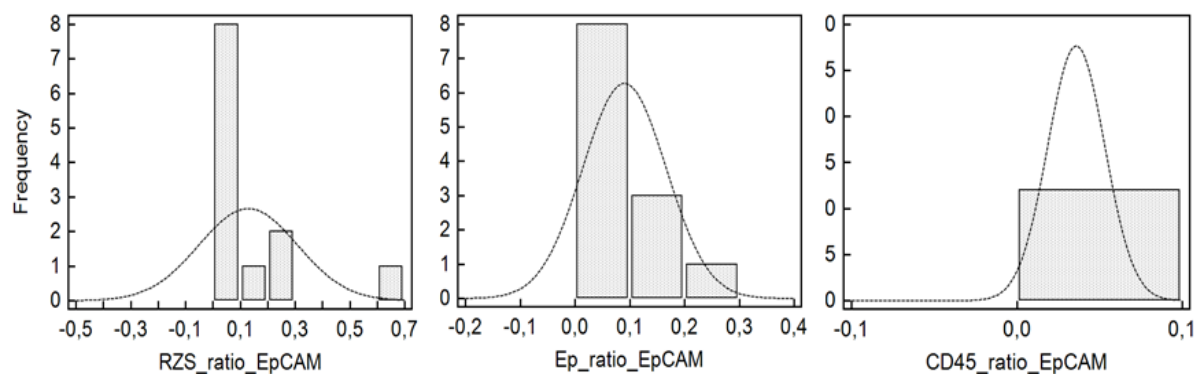
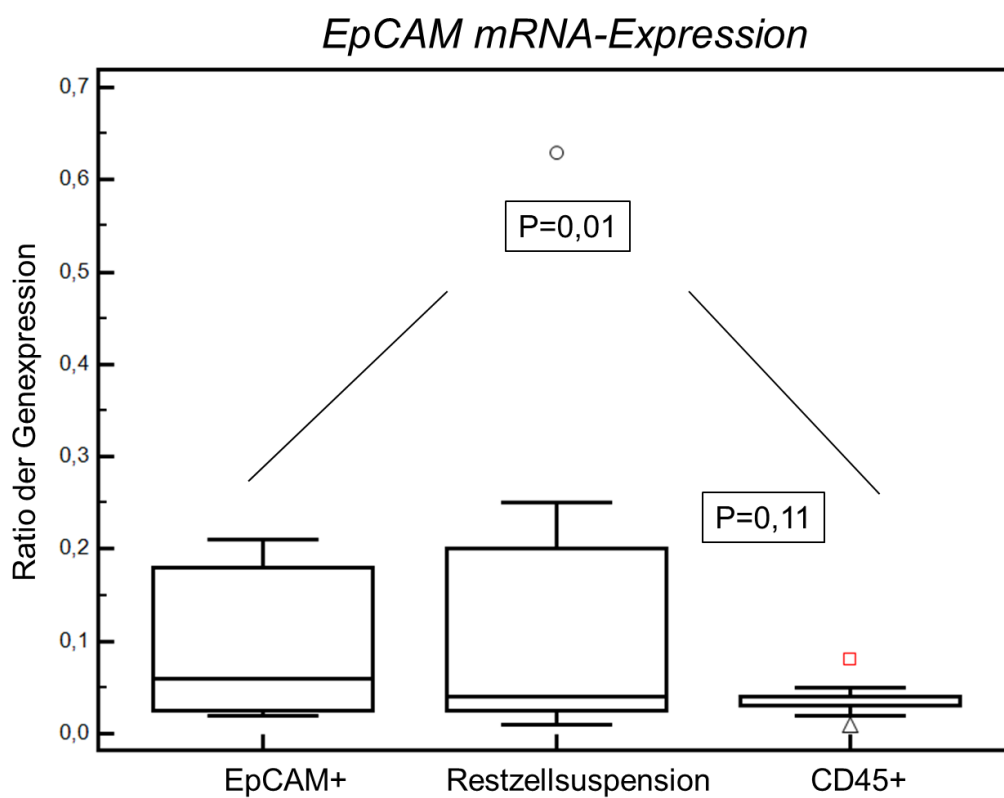


Abb. 34: Histogramme der Messwert-Verteilung in den einzelnen Fraktionen (n=14)

A)



B)

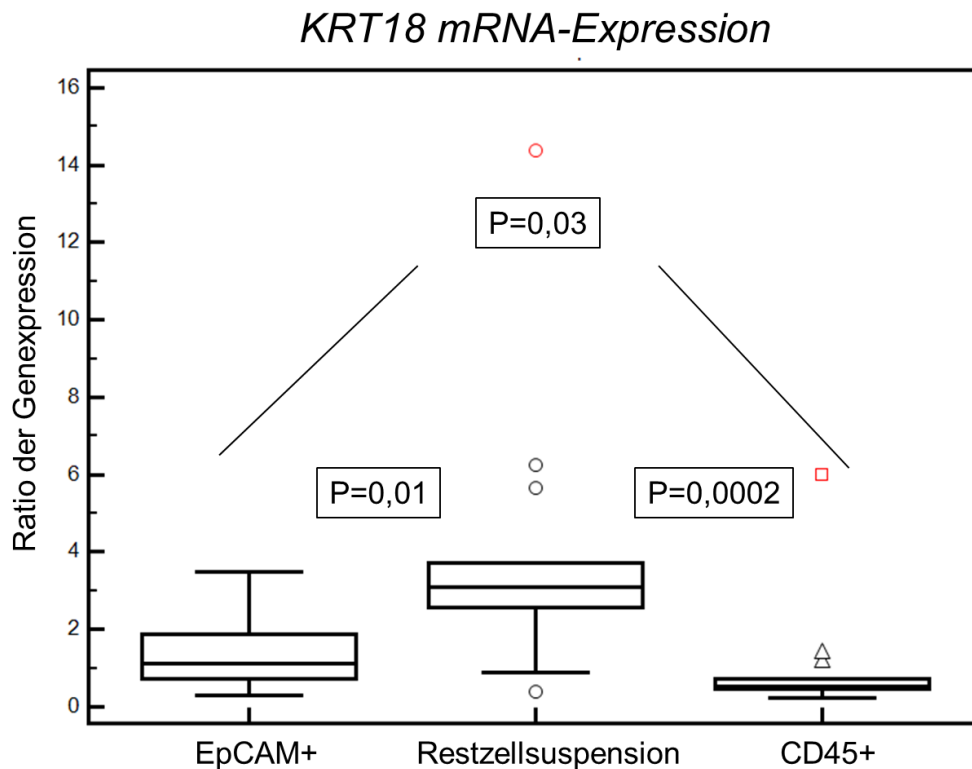


Abb. 35: mRNA-Expressionen von *EpCAM* und *KRT18* in den einzelnen Fraktionen nach CTC-Anreicherung (CD45+: Fraktion der CD45-positiven, bead-gebundenen depletierten hematopoetischen Zellen; EpCAM+: Positive angereicherte Fraktion der EpCAM-positiven, bead-gebundenen Zellen; Restzellsuspension: verbleibende Fraktion nach Entfernung der CD45-positiven und der EpCAM-positiven Zellen). A) *EpCAM*-mRNA-Expression B) *KRT18*-mRNA-Expression

4.3.3 Identifizierung prognostischer Marker aus CTC von HCC-Patienten

Primer und Schmelzkurven (Verdünnungsreihe)

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob mittels der oben beschriebenen Methode genetische Marker bei Patienten mit HCC unter Therapie messbar und mit dem therapeutischen Ansprechen korrelierbar sind. Da die vorliegende Doktorarbeit dem Kooperationsprojekt Bio.NRW zugrunde liegt, in dem neue Marker für das Therapieansprechen identifiziert und gemeinsam mit bereits beim HCC beschriebenen Markern validiert werden, wurden folgende Marker verwendet: *TGFβ*, *HGFAC*, *Hifα*, *AFP*, *APC*, *IGFBP1* und *KRT19*. Das Detektionsvermögen der Primer wurde, wie oben beschrieben, in einer RNA-Verdünnungsreihe getestet (Abb. 36 und Tabelle 9). Anschließend wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt (Abb.37).

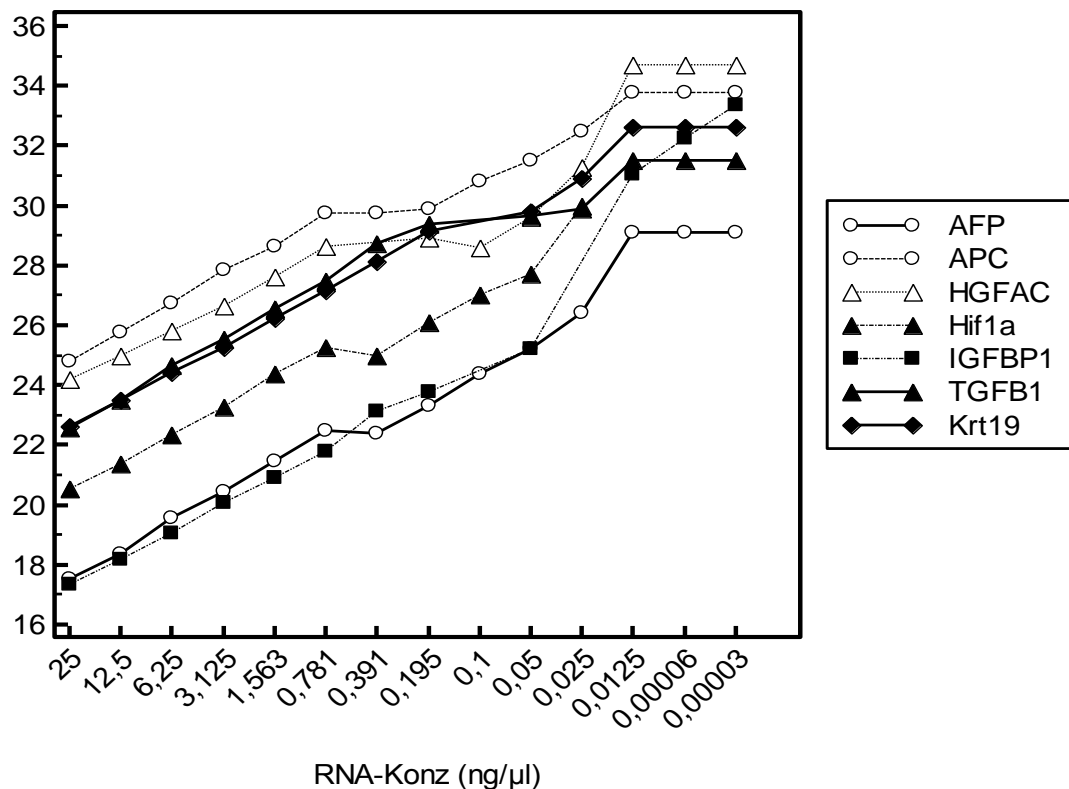
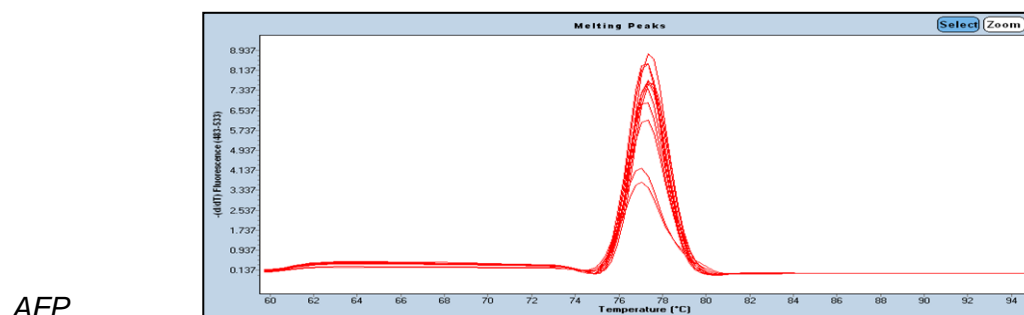


Abb. 36: Anstieg der Ct-Werte bei sinkender RNA-Konzentration

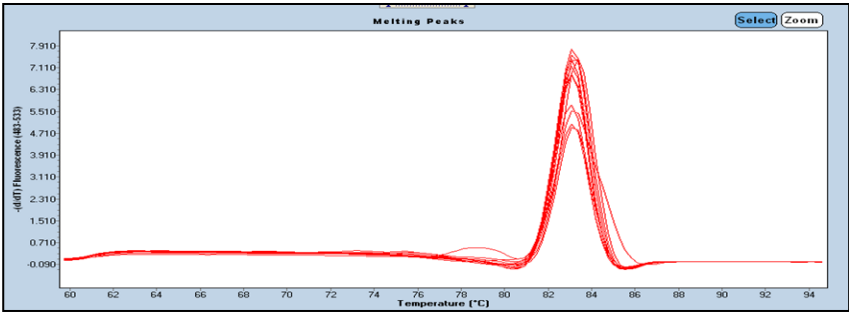
Gen	Ct-Wert Plateau
<i>AFP</i>	29,1
<i>APC</i>	33,8
<i>HGFAC</i>	34,7
<i>Hif1a</i>	39,75
<i>IGFBP1</i>	33,35 (Plateau noch nicht erreicht)
<i>TGFB1</i>	31,5
<i>Krt19</i>	32,6

Tabelle 9: Plateaubereiche der Primer.

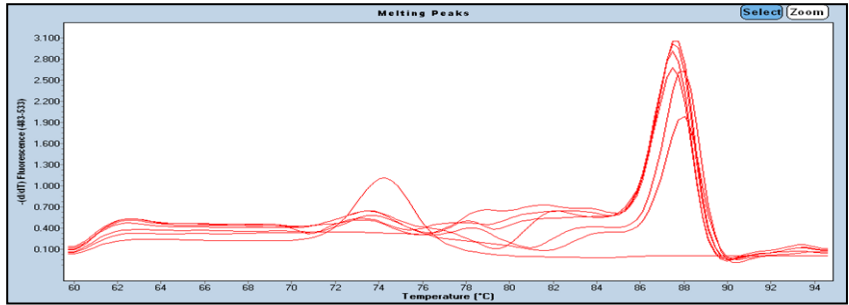
A)



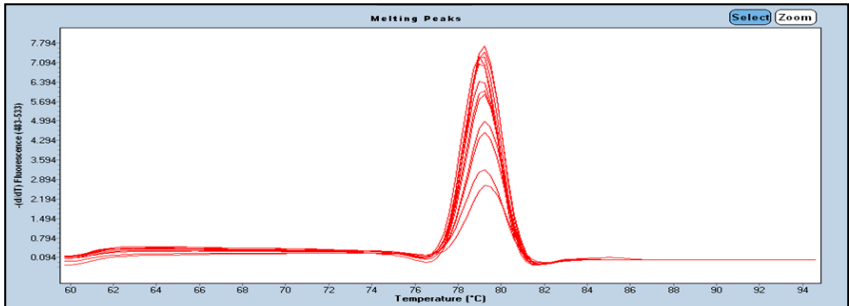
APC



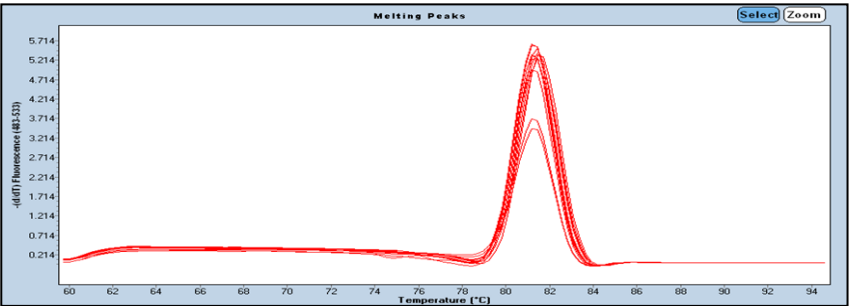
HGFAC



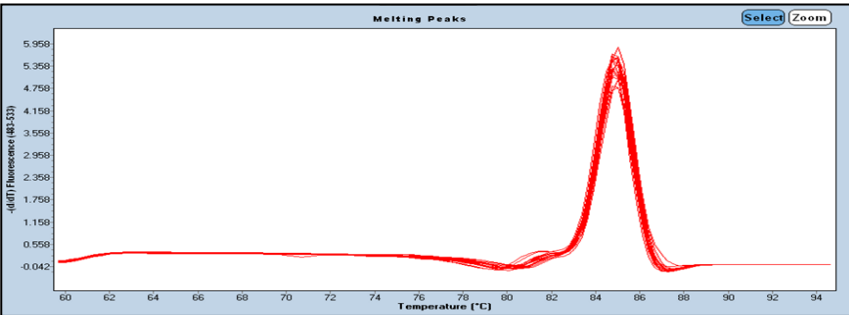
Hif1a



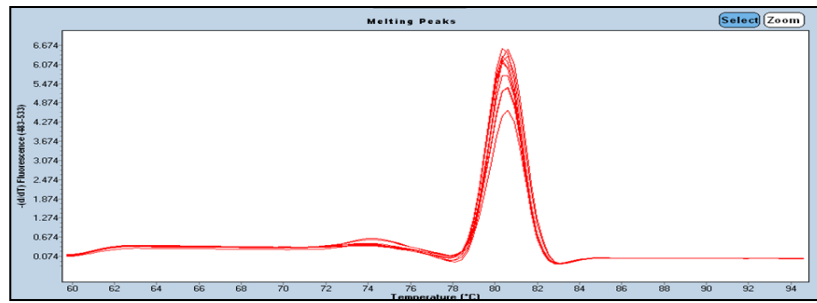
IGFBP1



KRT19

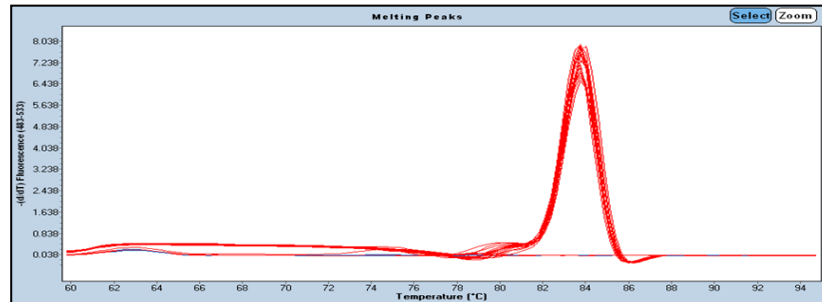


TGF β

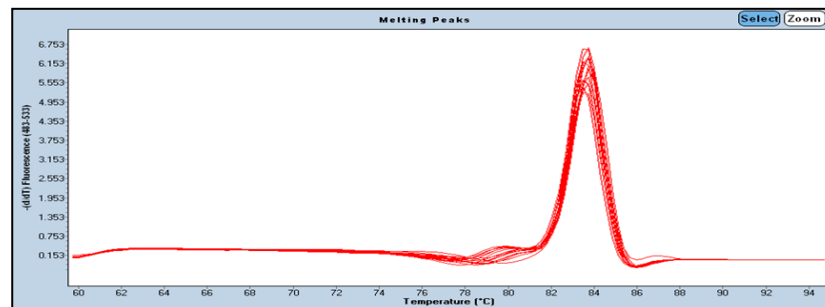


B)

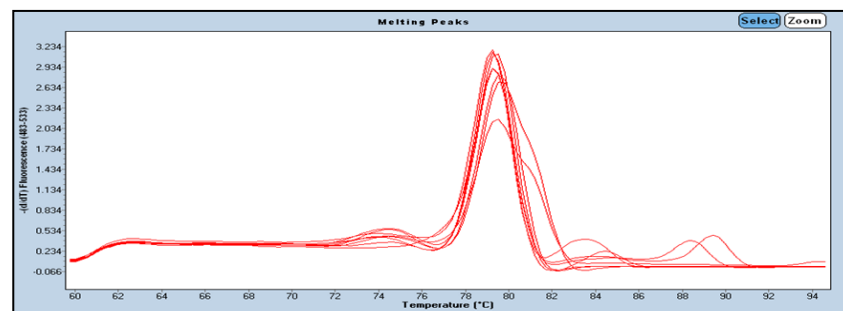
APC



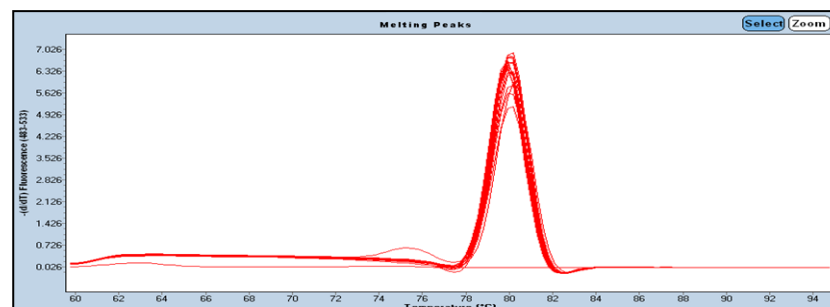
AFP



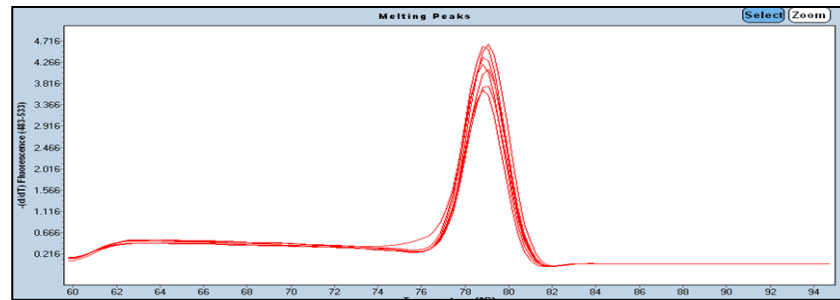
HGFAC



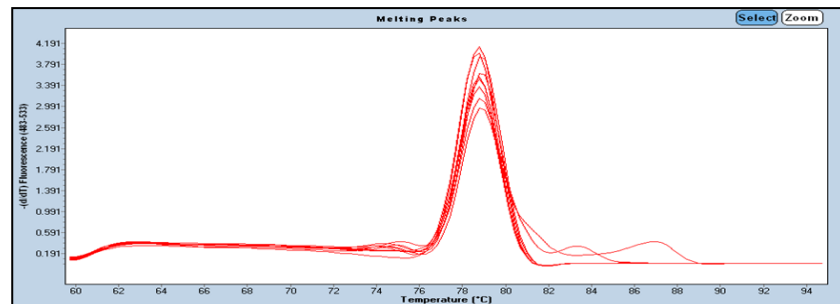
Hif1 α



IGFBP1



KRT19



TGFβ

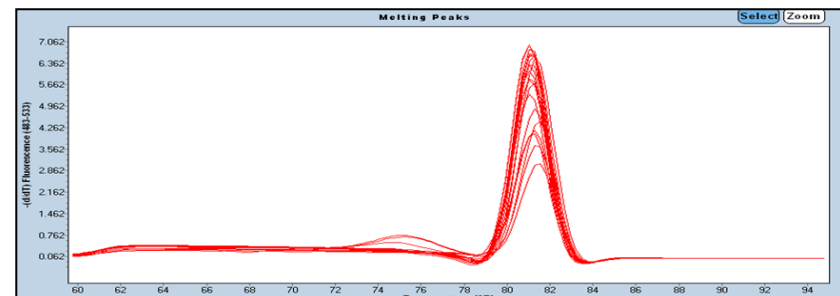


Abb. 37: Schmelzkurven der PCR-Produkte mit den Primern *KRT19*, *TGFb*, *HGFAC*, *Hifa*, *AFP*, *APC*, *IGFBP1* in A) je 2µl Hep G2-RNA in einer Konzentrationsreihe von 1,5-0,0125 ng/µl. B) in HCC-Patientenproben (Beispiele von Schmelzkurven)

Verlaufsmessung

Die mRNA-Expressionen der ausgewählten Gene wurden in EpCAM-positiv isolierten CTC-Suspensionen von 14 HCC Patienten (Trainings-Set siehe Tabelle 10) im Verlauf einer lokal-ablativen Therapie (SIRT) zu 3 verschiedenen Zeitpunkten gemessen. Als Referenz wurde das Housekeeping-Gen Beta-Aktin mitgemessen und die Differenz $\Delta Ct = Ct_{\text{Target}} - Ct_{\text{BACT}}$ zwischen Zielgen und Beta-Aktin bestimmt. Dann wurde die Änderung $\Delta\Delta Ct$ der Genexpression zwischen den einzelnen Zeitpunkten bestimmt; d.h. die Änderung zwischen 1. und 2. Untersuchung ($\Delta\Delta Ct_{u2} = \Delta Ct_{u2} - \Delta Ct_{u1}$) zwischen 1. und 3. Untersuchung ($\Delta\Delta Ct_{u3} = \Delta Ct_{u3} - \Delta Ct_{u1}$) sowie zwischen 3. und 2. Untersuchung ($\Delta\Delta Ct_{u3_2} = \Delta Ct_{u3} - \Delta Ct_{u2}$). Anschließend wurde die Ratio der Änderung der Genexpression zwischen den Zeitpunkten gebildet: $\text{Ratio } \Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Demographische Merkmale der Patienten				
Merkmal	Trainings-Set (n=14)		Validierungs-Set (n=11)	
	No.	%	No.	%
Stadium				
II	4	29	3	27
IIIa/b	9	64	3	27
IV	1	7	5	45
Tumorgröße (mm)				
Median	78		46	
Streuung	34-181		21-140	
Child Status				
A	14	100	9	82
B	na		2	18
Chronische virale Hepatitisinfektion				
HBV	2	14	2	18
HCV	4	29	4	36
Alter (Jahre)				
Median	64		68	
Streuung	29-74		18-75	
Geschlecht				
Männlich	9	64	8	73
Weiblich	5	36	3	27
Ansprechen				
SD	7	50	5	45
PD	7	50	6	55
Serologisches AFP (ng/ml)				
Median	524		30.7	
Streuung	1,5-852800		7,1-4401	
Bilirubin (mg/dl)				
Median	1.1		0.8	
Streuung	0,3-8,7		0,3-3	
LDH (U/l)				
Median	254		185	
Streuung	182-411		112-438	
Abkürzungen: SD, Stabilisierung (Stable Disease); PD, Progression (Progressive Disease); LDH, Lactatdehydrogenase.				

Tabelle 10: Klinische Daten der Patienten für qRT-PCR.

4.3.3.1 Trainings-Set

Spearman's Korrelation

Mittels Spearman's Rangkorrelationskoeffizient wurden die Genexpressionen als kontinuierliche Variablen mit dem Therapieansprechen (Progression bzw. Response) sowie mit Parametern des Erkrankungsverlaufs wie Serum-AFP, Bilirubin, LDH und DCP korreliert. In der untersuchten Studiengruppe bestätigte sich der signifikante Zusammenhang zwischen

Progression und Anstieg des Serum-AFP-Levels ($p=0,0388$) bzw. des LDH ($p=0,0033$). Die Expression von *KRT19* zum Zeitpunkt u2 zeigte eine signifikante Korrelation mit der Progression ($p=0,0522$) und mit Bilirubin ($p=0,0154$). *APC*- und *AFP*-mRNA Expressionen waren korreliert mit Bilirubin ($p=0,0594$ und $p=0,0325$). Die Expressionen von *Hif1 α* ($p=0,0548$) und *HGFAC* ($p=0,0413$) waren korreliert mit Serum-AFP. Das Sinken der *IGFBP1* ($p=0,0392$) und *TGF β* ($p=0,0361$)-Expressionen zeigte signifikante Korrelationen zu LDH. Die untersuchten Gene zeigten eine signifikante gegenseitige Korrelation (Abb. 38). Beispielsweise war *IGFBP1* signifikant korreliert mit *AFP* ($p=0,0065$), *APC* ($p=0,0217$), *HGFAC* ($p=0,0125$) und *KRT19* ($p=0,0053$) und zeigte eine Tendenz zur signifikanten Korrelation mit *Hif1 α* ($p=0,0667$).

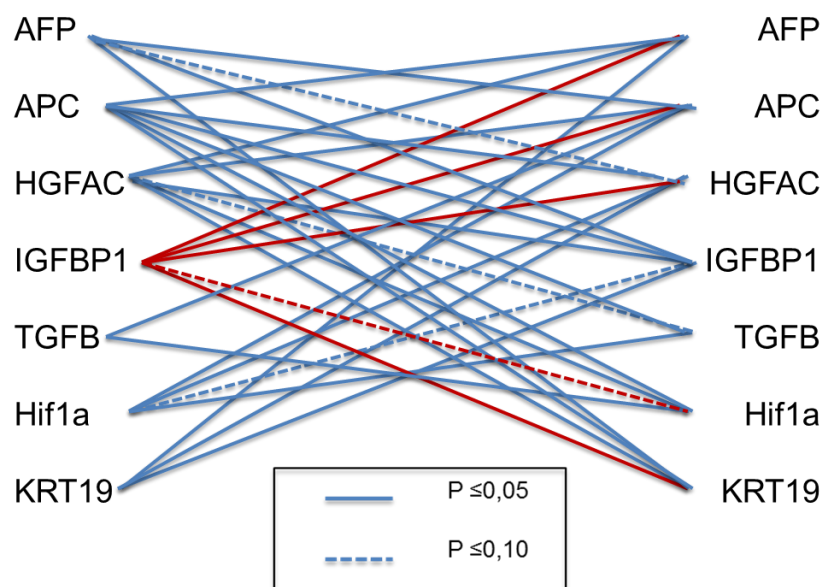
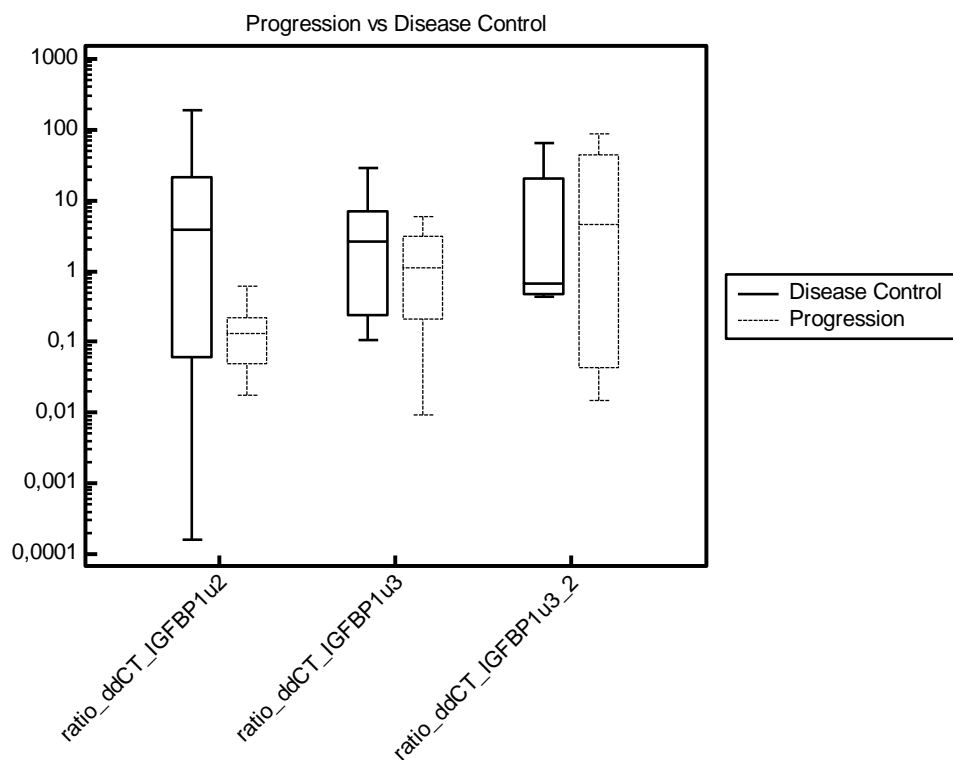


Abb. 38: Darstellung der gegenseitigen Korrelation der untersuchten Zielgene.

Änderung der Genexpressionen im Verlauf

Die Änderungen der Genexpressionen zwischen den einzelnen Zeitpunkten wurden jeweils bei den Patienten mit einer Progression unter Therapie (progressive disease, PD) bzw. mit Krankheitskontrolle (disease control = partial response, PR oder stable disease, SD) analysiert. *APC* zeigte die größte Expressionsänderung zwischen 1. und 3. Messzeitpunkt. Die Expressionen von *HGFAC*, *TGF β* und *Hif1 α* zeigten die größte Änderung zwischen der 2. und 3. Untersuchung. *AFP*, *IGFBP1* ($p=0,06$), *KRT19* und *TGF β* zeigten die größten Expressionsänderungen zwischen 1. und 2. Untersuchung (Abb. 39).

A)



B)

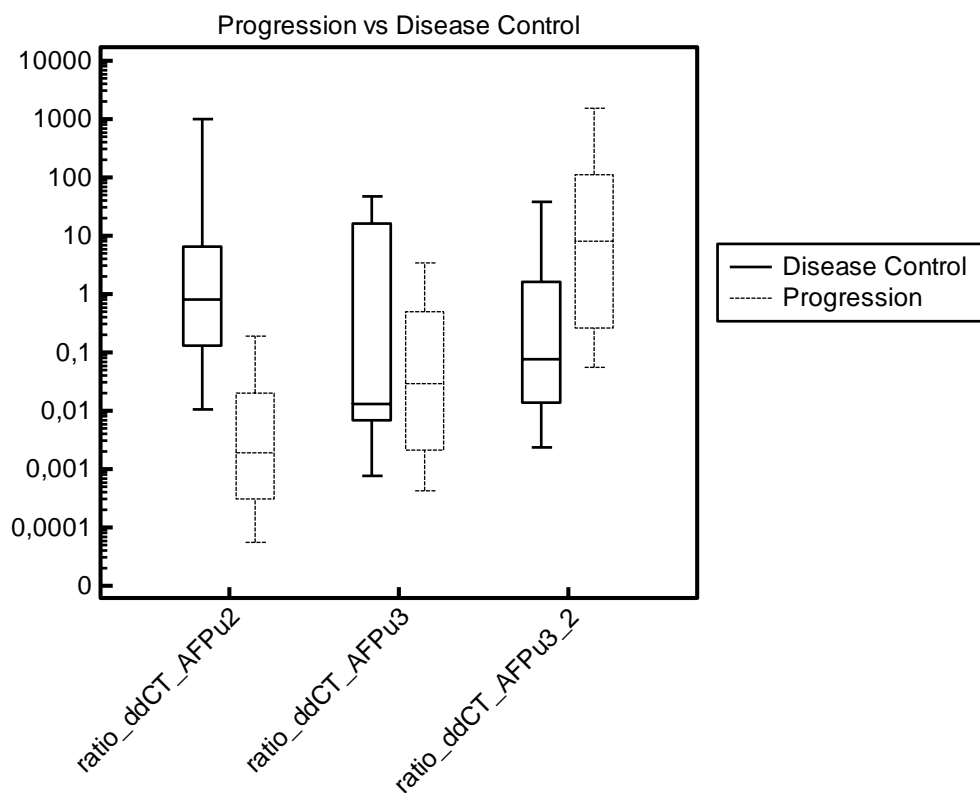


Abb. 39: Darstellung der Genexpressionsänderung zwischen den Untersuchungszeitpunkten. A) *IGFBP1*; B) *AFP*.

Multiple lineare Regressionsanalyse

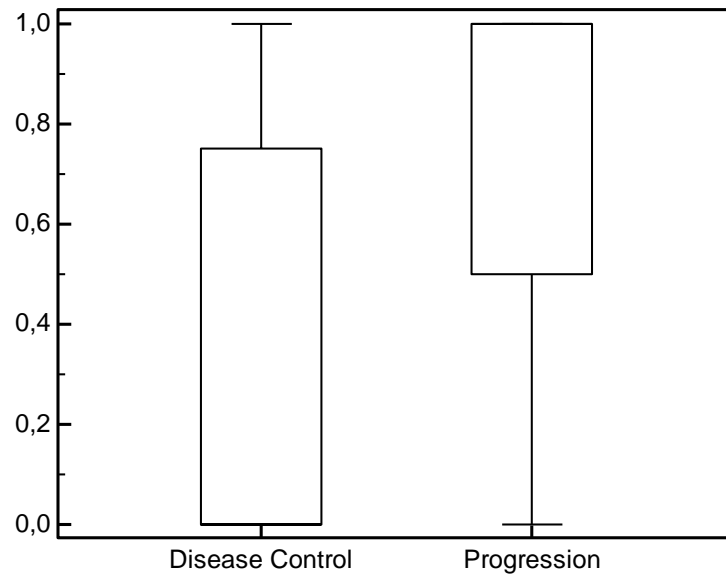
Jede Genexpression wurde in einem linearen multivariaten Regressionsmodell zusammen mit klinischen Markern des Krankheitsverlaufs wie AFP, Bilirubin und LDH auf die unabhängige Korrelation mit dem therapeutischen Ansprechen getestet. Dabei zeigte die *IGFBP1*-Expressionsänderung zum 2. Untersuchungszeitpunkt eine unabhängig signifikante Assoziation zum Ansprechen mit $p=0,0062$ und einer Signifikanz des Gesamtmodells von $p=0,012$. Auch *HGFAC* ($p=0,0178$; model fit $P=0,008$) und *AFP* ($p=0,04$; model fit $P=0,008$) zeigten signifikante Korrelationen zum therapeutischen Ansprechen. Eine Tendenz zur Signifikanz wurde bei den Expressionsänderungen von *TGFβ* ($p=0,117$) und *APC* ($p=0,1325$) zwischen dem 1. und 3. Abnahmezeitpunkt beobachtet. In einem statistischen Modell mit den beiden Parametern *IGFBP1* mRNA und *AFP* Gen- bzw. Proteinexpression wurde *AFP* (Serum und mRNA) vom Modell ausgeschlossen. *IGFBP1* war signifikant ($p=0,0062$) zur Progression korreliert mit einem Model-Fit von $p=0,01$ (Tabelle 11).

Variablen	Signifikanzlevel P (Backward)	Signifikanzlevel des Gesamtmodells
IGFBP1_u2	0,0062	P=0,012
Serum AFPu2	0,02	
Bilirubin u2	0,018	
LDHu2	0,0579	
AFP_u2	0,0405	P=0,008
Serum AFPu2	0,0085	
Bilirubin u2	0,0117	
LDHu2	Ausgeschlossen	
HGFAC_u2	0,0178	P=0,008
Serum AFPu2	ausgeschlossen	
Bilirubin u2	0,0492	
LDHu2	0,0031	
TGFB_u3	0,1177	P=0,102
Serum AFPu3	0,1531	
Bilirubin u3	0,823	
LDHu3	0,1026	
APC_u3	0,1325	P=0,121
Serum AFPu3	0,1353	
Bilirubin u3	0,968	
LDHu3	0,0544	
TGFB_u3_2	0,1713	P=0,072
Serum AFPu2	0,3522	
Bilirubin u2	0,5419	
LDHu2	0,0813	
IGFBP1_u2	0,0062	P=0,01
AFP_u2	ausgeschlossen	
Serum AFPu2	ausgeschlossen	
Bilirubin u2	0,0018	
LDHu2	0,0078	

Tabelle 11: Darstellung der signifikanten multiplen linearen Regressionsmodelle der Genexpressionen.

Um zu überprüfen, ob sich die Patienten anhand der Genexpressionen in distinkte Gruppen mit unterschiedlicher Ansprechwahrscheinlichkeit einteilen lassen, wurde der Median (50te Perzentile) als Trennpunkt (Cut-Point) für hohe bzw. niedrige Expression gewählt und mit dem objektiven Ansprechen nach RECIST-Kriterien korreliert (Abb. 40).

A)



B)

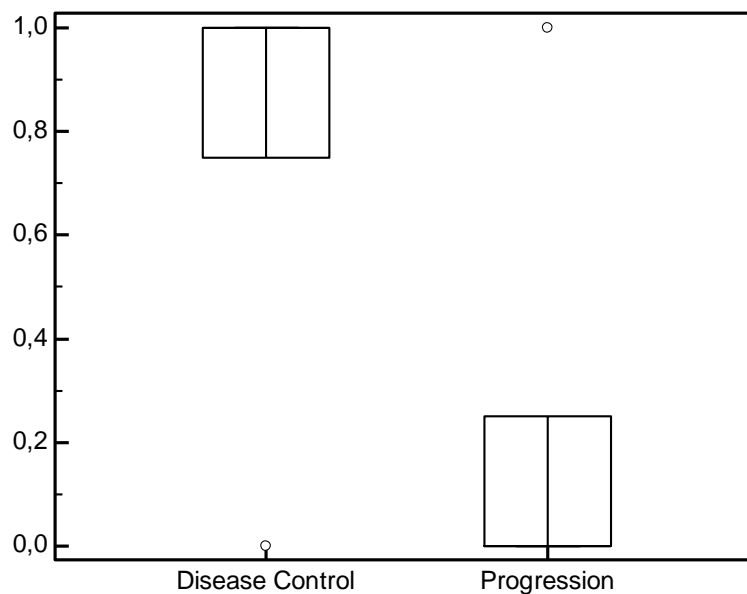


Abb. 40: Einteilung der Patienten in niedrig- und hoch-exprimierte Gruppen (Median) mit entweder Disease Control oder Progression. A) *AFP* Expression. B) *IGFBP1* Expression.

Um zu testen, ob die Assoziation der Genexpressionen dieser Subgruppen mit dem therapeutischen Ansprechen unabhängig von bereits etablierten Markern sein könnte, wurde ein Regressionsmodell unter Einschluss von AFP, Bilirubin und LDH erstellt. Die Expressionsänderung von *IGFBP1* ($p=0,01$) und Serum-Bilirubin waren die einzigen Faktoren in dieser Patientenkohorte mit einer signifikanten unabhängigen Korrelation zum Ansprechen, mit einer Signifikanz des Gesamtmodells von $p=0,016$ (Tabelle 12). Die *AFP* mRNA-Expression ($p=0,0566$) sowie Serum-AFP ($p=0,0792$) zeigten eine Tendenz zur Signifikanz (model fit $P=0,011$). Der Trennpunkt für die *IGFBP1*-Expression wurde auf die 90te Perzentile verschoben, um hoch von niedrig exprimierenden Patienten zu unterscheiden. Die Regressionsanalyse wurde erneut mit dem Resultat durchgeführt, dass *IGFBP1* sowie alle Serum-Tumormarker signifikant mit der Response (Progression) korreliert waren (Tabelle 12).

Variablen	Signifikanzlevel P (Backward)	Signifikanzlevel des Gesamtmodells
Low_ratio ddCT_IGFBP1_u2 (>0,16)	0,0132	P=0,016
Serum AFPu2	ausgeschlossen	
Bilirubin u2	0,0176	
LDHu2	ausgeschlossen	
High_ratio ddCT_AFP_u2 (>0,1)	0,0566	P=0,011
Serum AFPu2	0,0792	
Bilirubin u2	0,0052	
LDHu2	ausgeschlossen	
Low_ratio ddCT_IGFBP1_u2 (>10,13)	0,0115	P=0,022
Serum AFPu2	0,0352	
Bilirubin u2	0,0319	
LDHu2	0,0143	

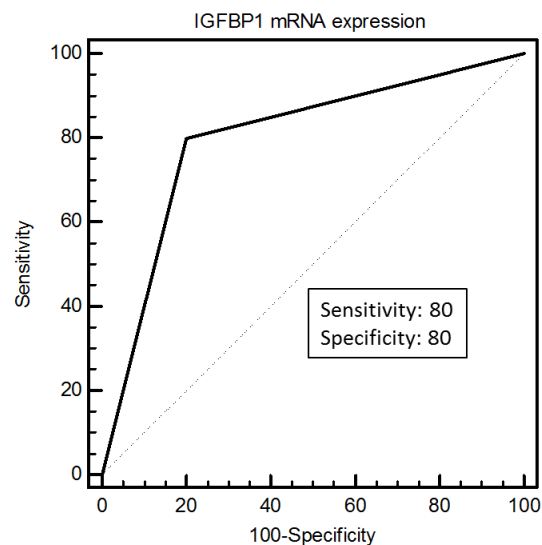
Tabelle 12: Darstellung der signifikanten multiplen linearen Regressionsmodelle nach Unterteilung in hoch- und niedrig exprimierende Gruppen mittels Trennpunkt bei 50ter Perzentile (Median) bzw. des multiplen linearen Regressionsmodells der *IGFBP1*-Expression nach Verschiebung des Cut-Points auf die 90te Perzentile (>10,13).

Grenzwertoptimierungskurven-Analyse

Mittels der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurven Analyse konnte überprüft werden, ob die gewählten Trennpunkte der Genexpressionen als diagnostisches Kriterium für therapeutisches Ansprechen eine ausreichende Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) und Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) haben. Die *IGFBP1* mRNA Expression (> 50te Perzentile) hatte eine Sensitivität von 80% und eine Spezifität von 80% für die Diagnose Progredienz

der Erkrankung (Abb. 41). Die Fläche unterhalb der Kurve (area under the curve, AUC) betrug 0,8 mit einem Signifikanzniveau von $p=0,0339$ (Konfidenzintervall CI von 0,44 bis 0,98). Die Verlegung des Trennpunkts auf die 90te Perzentile (10,13) lieferte eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 20%, wobei die AUC nur 0,600 betrug und keine Signifikanz erreicht wurde. Die ROC-Analyse der *AFP* mRNA-Expression zeigte Tendenz zur Signifikanz ($p=0,1350$) sowie eine Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 71,4%, wobei die AUC 0,732 betrug (Tabelle 13).

A)



B)

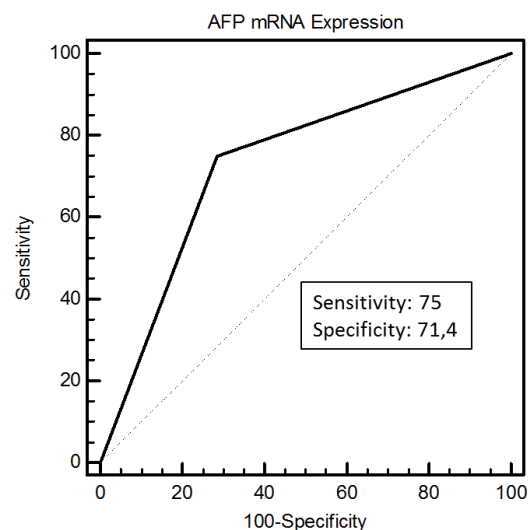


Abb. 41: ROC –Kurven der signifikanten Genexpressionen versus Progression A) *IGFBP1* (50te Perzentile). B) *AFP* (50te Perzentile).

Ratio_ddCT_Gen (cut-point)	AUC	Sensitivität	Spezifität	CI	P
IGFBP1_u2(>0,16)	0,8	80	80	0,444-0,975	0,0339
AFP_u2(>0,1)	0,732	75	71,3	0,395-0,942	0,135
TGFb_u3(>1,38)	0,571	57	57	0,289-0,823	0,6171
TGFb_u3_2(>1,66)	0,536	50	57	0,249-0,806	0,8126
APC_u3(>1,0)	0,586	60	57	0,279-0,850	0,5893
HGFAC_u2(>1,07)	0,536	50	57	0,249-0,806	0,8126
IGFBP1_u2 (>10,13)	0,6	100	20	0,262-0,878	0,3173

Tabelle 13: Details der ROC-Analysen

Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit Log Rank Test

Mittels Überlebenskurven basierend auf dem Kaplan-Meier Log Rank Test konnte gezeigt werden, dass eine niedrige *IGFBP1*-Expression (<70te Perzentile) signifikant mit kürzerer TTP korreliert war ($p=0,04$; [HR<0,1]; Abb.42).

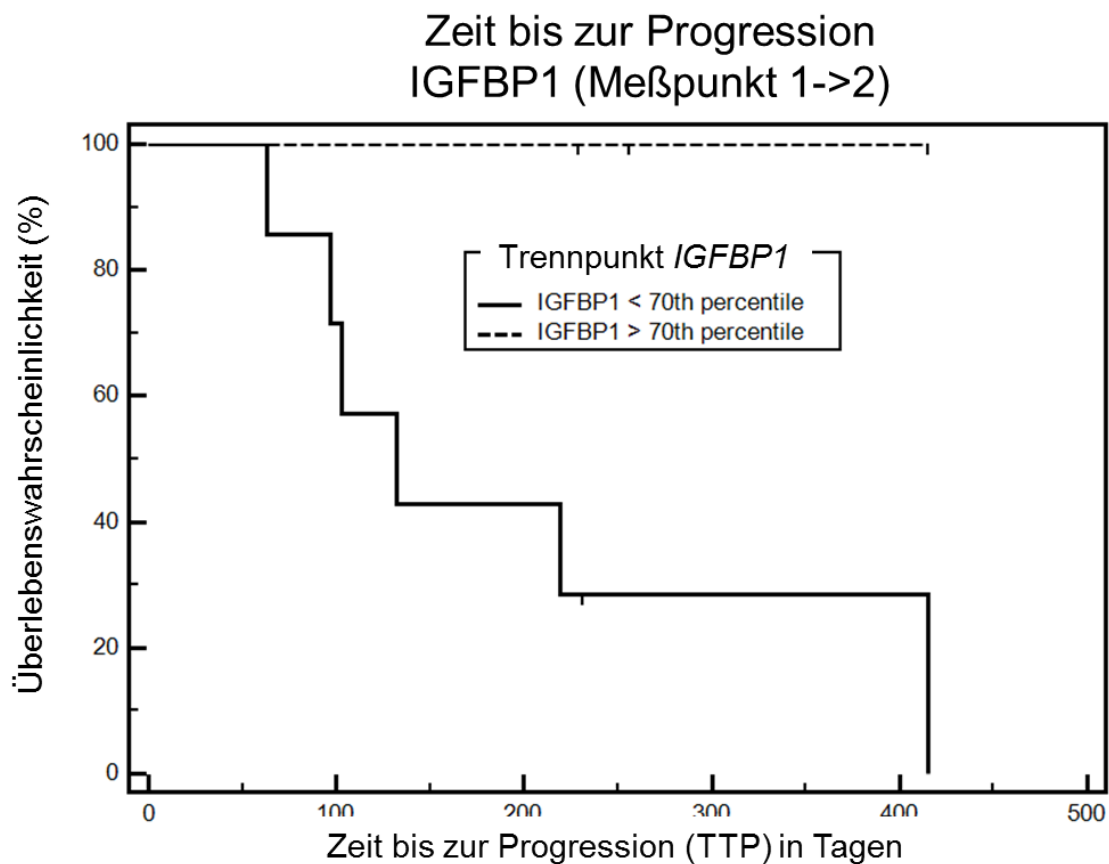


Abb. 42 Kaplan-Meier Test der *IGFBP1* mRNA Expression in Assoziation mit TTP ($p=0,04$; HR<0,1).

4.3.3.2 Validierungs-Set

Die mRNA-Expressionen von *IGFBP1* wurden in EpCAM-positiv isolierten CTC-Suspensionen von 11 weiteren HCC Patienten (Validierungs-Set siehe Tabelle 10) im Verlauf der SIRT zu 3 verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Spearman's Rangkorrelationskoeffizient

Mit Hilfe des Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten wurde die *IGFBP1*-Expression zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten als kontinuierliche Variable mit dem objektiven Ansprechen nach RECIST und Serum-Tumormarkern AFP, Bilirubin und LDH korreliert. Dabei zeigte *IGFBP1* entsprechend dem Trainings-Set eine signifikante Korrelation mit LDH ($p=0,0330$) und auch mit Bilirubin ($p=0,0109$). LDH war mit Serum-AFP ($p=0,0844$) korreliert und signifikant mit Bilirubin ($p=0,0209$) korreliert. Bilirubin zeigte eine Tendenz zur signifikanten Korrelation mit der Progression ($p=0,1144$).

Multiple Regression

Die Änderungen der *IGFBP1* mRNA-Expressionen zwischen den verschiedenen Zeitpunkten wurden, wie oben beschrieben, als kontinuierliche Variable jeweils zusammen mit den Serum-Tumormarkern AFP, Bilirubin und LDH in einem multivariaten Regressionsmodell mit dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie als abhängiger Variable getestet. Die *IGFBP1*-Expression als kontinuierliche Variable korrelierte erneut signifikant mit einem Therapieversagen und somit mit Krankheitsprogression ($p=0,0466$). Auch Serum AFP ($p=0,0043$) und Bilirubin ($p=0,0680$) blieben im Modell enthalten. Nur LDH wurde ausgeschlossen. Das Gesamtmodell zeigte mit $p=0,125$ Tendenz zur Signifikanz. Die *IGFBP1*-Expressionsänderungen zwischen 3. und 1. sowie zwischen 3. und 2. Abnahmezeitpunkt zeigten im Validierungs-Set ebenfalls jeweils signifikante Korrelationen zur Progression, wobei beide Regressionsmodelle jeweils den Signifikanzlevel ($p<0,05$) erreichten (Tabelle 14).

Variablen	Signifikanzlevel P (Backward)	Signifikanzlevel des Gesamtmodells
IGFBP1_u2	0,0466	P=0,125
Serum AFPu2	0,00429	
Bilirubin u2	0,068	
LDHu2	ausgeschlossen	
IGFBP1_u3	0,011	P=0,027
Serum AFPu2	ausgeschlossen	
Bilirubin u2	0,0207	
LDHu2	ausgeschlossen	
IGFBP1_u3_2	0,007	P=0,015
Serum AFPu2	ausgeschlossen	
Bilirubin u2	0,0173	
LDHu2	ausgeschlossen	

Tabelle 14: Darstellung der signifikanten multiplen linearen Regressionsmodelle der *IGFBP1* mRNA-Expressionen im Validierungs-Set.

Die Dichotomisierung der *IGFBP1*-Expression im Validierungs-Set zeigte beim Median keine Signifikanz, jedoch bei der 75te Perzentile dieser Messwertreihe. Ein Regressionsmodell, welches die *IGFBP1*-Expression und die etablierten Serum-Tumormarker AFP, Bilirubin und LDH enthielt, zeigte erneut eine signifikante unabhängige Korrelation von *IGFBP1*-Veränderungen mit dem Therapieansprechen (Tabelle 15).

Variablen	Signifikanzlevel P (Backward)	Signifikanzlevel des Gesamtmodells
Low_ratio ddCT_IGFBP1_u3(>10,928)	0,0134	P=0,015
Serum AFPu3	0,034	
Bilirubin u3	0,0169	
LDHu3	0,0134	

Tabelle 15: Darstellung des signifikanten multiplen linearen Regressionsmodells der *IGFBP1* – Expressionsänderung zwischen 1. und 3. Untersuchungszeitpunkt im Validierungs-Set (Trennpunkt 75te Perzentile).

ROC-Kurven Analyse

Die ROC-Kurven Analyse der *IGFBP1*-Expression zeigte eine Sensitivität von 33,3% und eine Spezifität von 80%. Die AUC betrug 0,567 wobei kein Signifikanzlevel $p < 0,05$ erreicht wurde.

4.4 Kultivierung von CTC beim HCC

4.4.1 Kultivierung von CTC nach sequentieller Positiv-Selektion

Zunächst wurde ein Spiking-Experiment als Positiv-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurde Vollblut einer gesunden Spenderin mit Hep G2-Zellen versetzt, welche mit der oben beschriebenen Methode positiv Isoliert wurden. Parallel wurde eine Blutprobe ohne zugesetzte Zellen mitgeführt. Nach sequentieller Positiv-Selektion mit CD45- und EpCAM-Beads, wurden die angereicherten EpCAM-bead-gebundenen Zellsuspensionen in Terasaki-Platten ausgesät. Die bead-gebundenen Hep G2-Zellen adhärten nach kurzer Zeit und zeigten sich vital und teilungsfähig. Abbildung 43 zeigt eine Aufnahme der Hep G2-Zellkultur am Tag 4. In der Blutprobe ohne zugesetzte Zellen waren keine adhärenen Zellen zu beobachten.

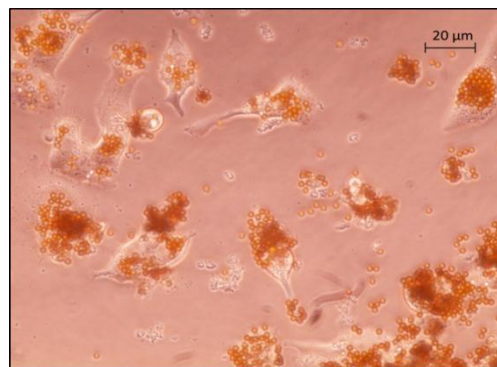


Abb. 43: Gespikte HepG2-Zellen nach Positiv-Selektion aus Blut in Terasaki-Platte ohne Beschichtung an Tag 4.

In einem weiteren Spiking-Experiment wurden verschiedene Beschichtungen der Zellkulturgefäße ausgetestet. Dazu wurde erneut Blut einer gesunden Spenderin mit Hep G2-Zellen versetzt, die nach sequentieller Positiv-Selektion auf Chamber Slides (BD) in Kultur gegeben wurden. Abbildung 44 zeigt das Verhalten der isolierten Hep G2-Zellen auf verschiedenen Beschichtungen (Kollagen, Fibronectin, Poly-D-Lysin). Der Versuch ergab, dass die Kollagenbeschichtung als am besten geeignet erschien, da hier die Zellen im Vergleich zur Fibronectin- und Poly-D-Lysin-Beschichtung besser adhärten und proliferieren konnten. Am Tag 7 waren auf dem kollagenbeschichteten Chamber-Slide am meisten Hep G2-Zellen zu beobachten.

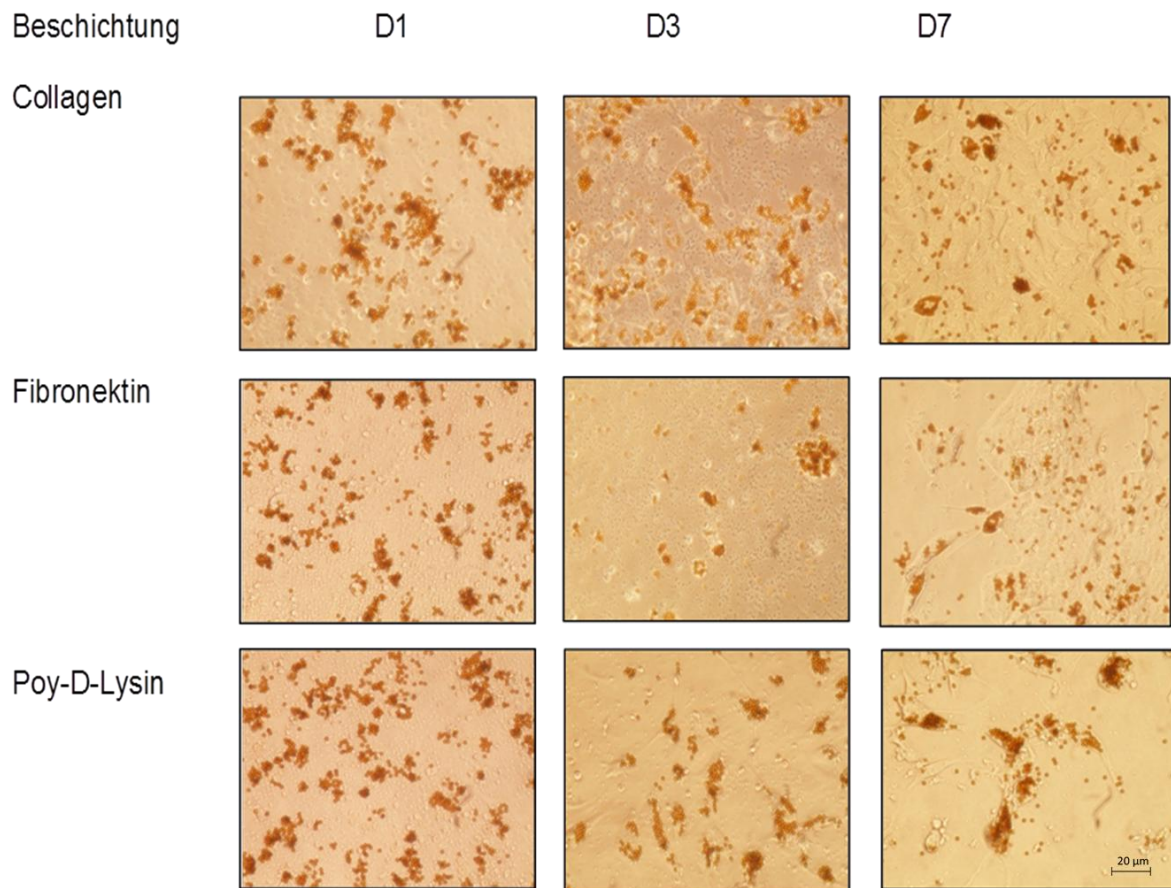
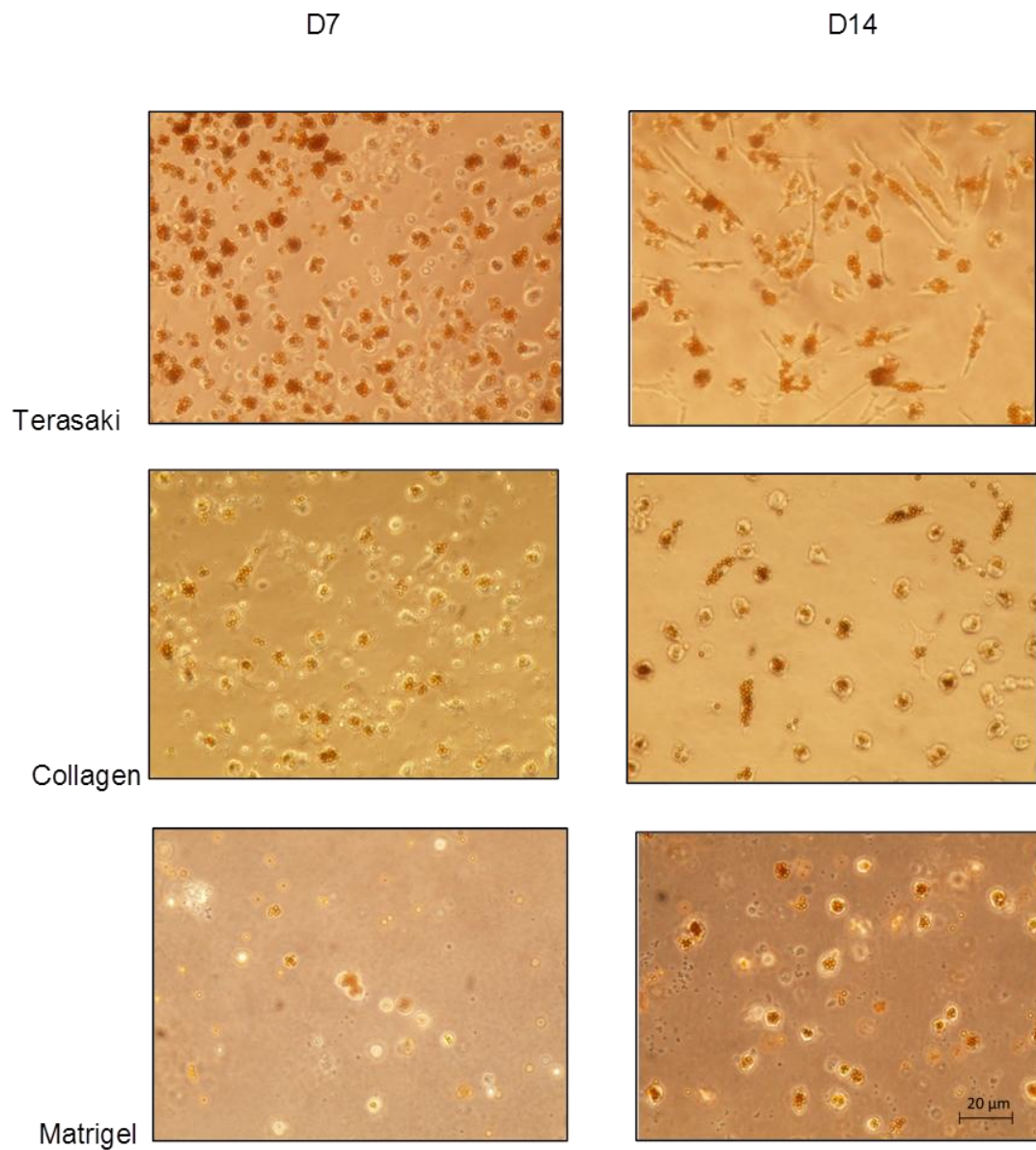


Abb. 44: Zellkultur von gespikten Hep G2-Zellen nach Positiv-Selektion aus Blut in Chamber-Slides mit unterschiedlichen Beschichtungen

Aus HCC-Patientenblut via Positiv-Selektion isolierte EpCAM-bead-gebundene Zellen wurden jeweils in unbeschichteten Terasaki-Platten, auf kollagenbeschichteten Chamberslides und in Matrigel (35 mm dish) mit dem oben beschriebenen Medium kultiviert. Die Zellen adhärten sowohl in der Terasaki-Platte als auch auf den kollagenbeschichteten Slides und migrierten in das Matrigel ein. Sie zeigten sich etwa 14 bis 21 Tage vital, jedoch ohne Proliferation (Abb.45).

A)



B)

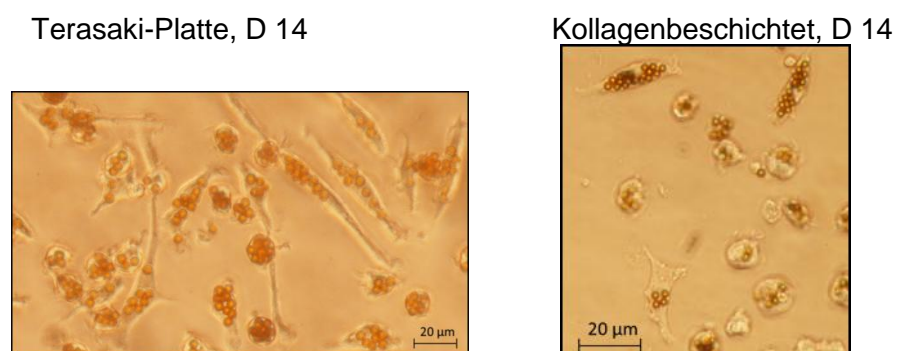


Abb. 45: **A)** Kultivierung von positiv isolierten CTC aus HCC-Patienten in Terasaki-Platte, auf Kollagen-beschichtetem Chamber-Slide und in Matrigel. **B)** Vergrößerung zweier Ausschnitte am Tag 14.

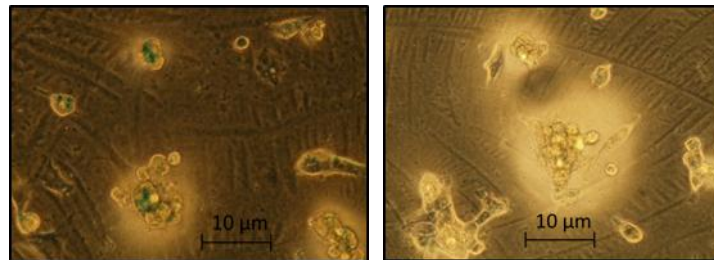
4.4.2 Zelluläre Seneszenz von CTC nach Positiv-Selektion

Hep G2- und HCT116-Zellkulturen wurden als Negativkontrollen mitgefärbt. Die geringe Blaufärbung der seneszenzbedingten β -Galactosidaseaktivität wurde als negativ gedeutet. Auch die nach Positiv-Selektion kultivierten CTC zeigten eine negative Färbung, d.h. sie waren in keinem seneszenten Zustand (Abb. 46).

A) Negativkontrollen:

Hep G2-Zellen

HCT116-Zellen



B) HCC-Patienten:

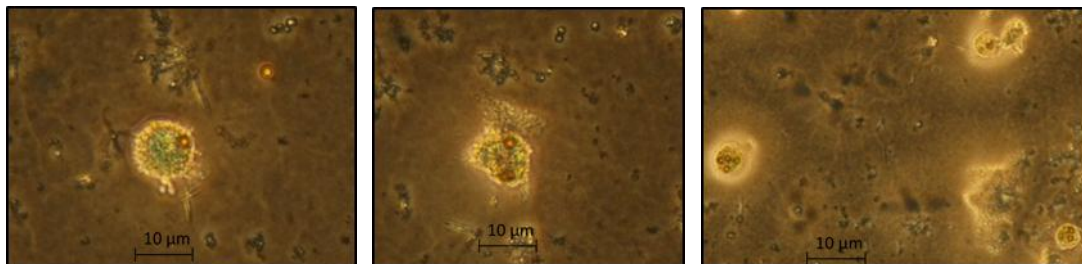


Abb. 46: Senescence Assay mittels Färbung der β -Galactosidaseaktivität. A) Proliferierende Zellkulturen als Negativkontrolle. B) EpCAM-positiv isolierte CTC aus HCC-Patienten.

4.4.3 Kultivierung von CTC nach Negativ-Selektion

Die CD45-depletierten Zellsuspensionen wurden in o.g. CTC-Medium in kollagenbeschichtete 24-well-Platten ausgesät und täglich mit PBS gewaschen und anschließend mit frischem Medium versetzt. Nach spätestens 3 Tagen waren die Leukozyten größten Teils weggewaschen, und es blieben verhältnismäßig große und relativ kleine adherente Zellen in den Kulturgefäßen haften (Abb. 47).

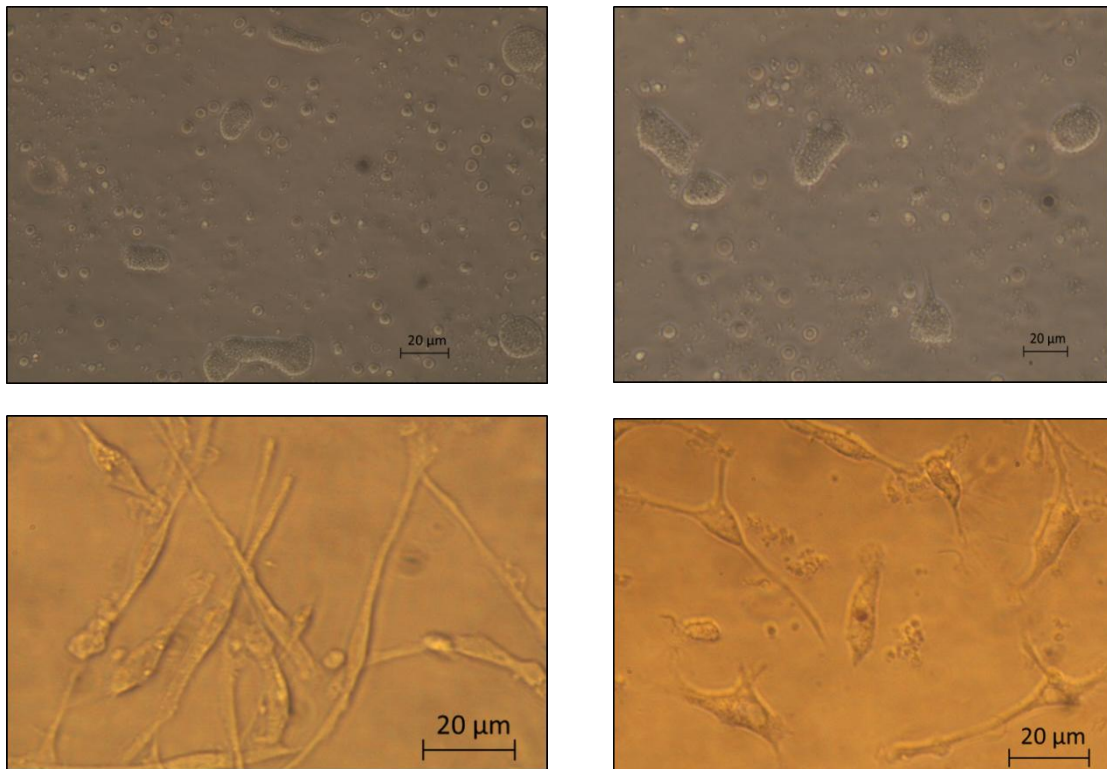


Abb. 47: Zellkulturen der Negativselektion verschiedener HCC-Patienten in kollagenbeschichteten 24-well-Platten an Tag 8.

4.4.4 Pan-CK-Färbung der nach Negativ-Selektion kultivierten CTC

Nach einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen wurden die Zellen in den 24-well-Platten mit PBS gewaschen und mit Ethanol fixiert. Nach Trocknung an der Luft folgte eine Färbung gegen Pan-CK mit alkalischer Phosphatase. Abbildung 48 zeigt Pan-CK positive adhärenente Zellen. Als Negativkontrollen wurden Blutproben von gesunden Spendern genommen und gleichbehandelt. Es waren keine adherenten Zellen in den Zellkulturgefäßen sichtbar.

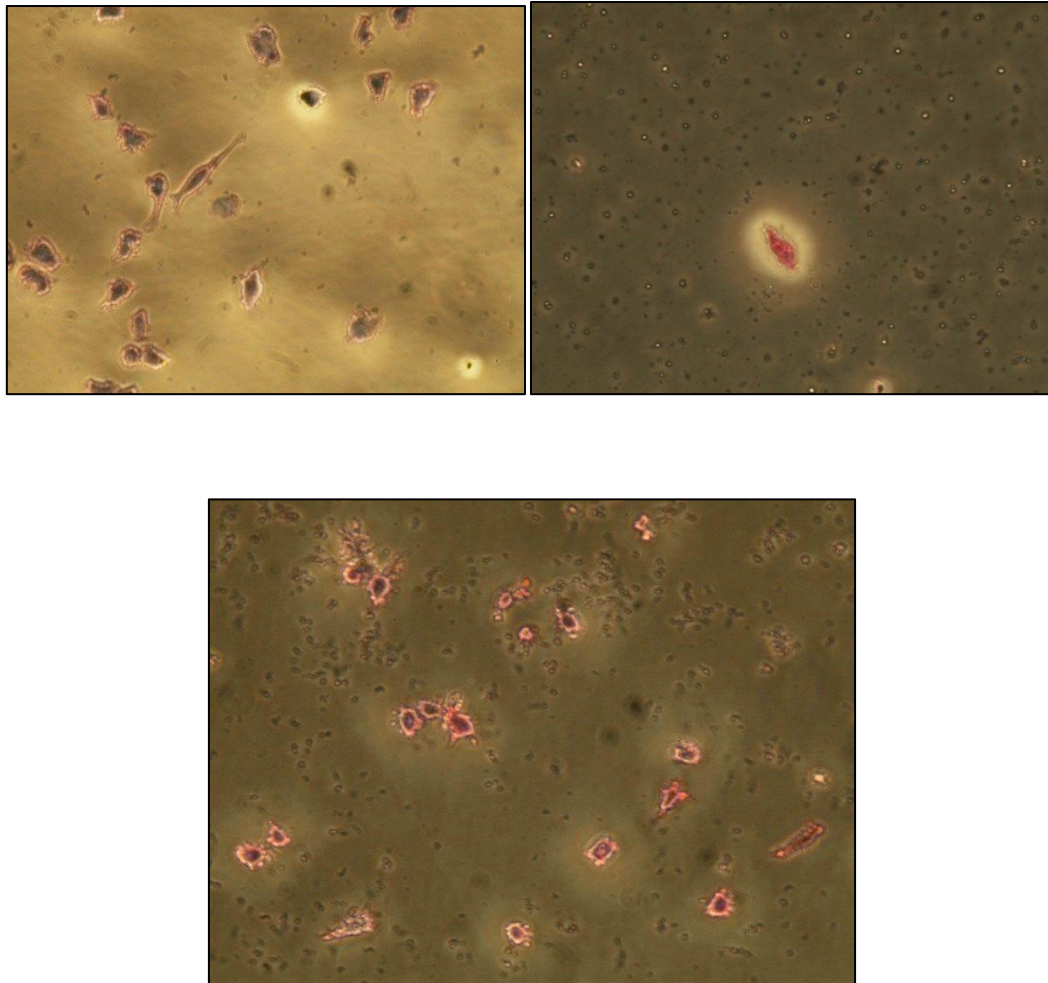


Abb. 48: Zellkultur von HCC-Patientenproben nach Neaktiv-Selektion mit positiver Pan-CK Färbung mit alkalischer Phosphatase.

4.4.5. Anwendung der Kurzzeitkultivierung

Auch ohne Proliferation konnte die CTC-Kultivierung zur Anwendung gebracht werden. Mit der beschriebenen Methode der Negativ-Selektion wurden CTC aus dem peripheren Blut von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) vor systemischer Cisplatin-Therapie isoliert und unter Standardzellkulturbedingungen für 2 Stunden *ex-vivo* mit Cisplatin (20µg/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, mit frischem Medium (siehe 3.8.9.) versetzt und 24 Stunden weiter kultiviert. Vor der Behandlung sowie 0; 2; 4 und 20 h nach der Behandlung wurden von diesen Kurzzeitkulturen Aliquote entnommen und mittels Cellspin-Zentrifugation auf Adhäsions-Objektträger gebracht, IF gefärbt und detektiert sowie fotografiert. Die Positionen der detektierten epithelialen Zellen wurden gespeichert. Nach alkalischer Denaturierung und einem Verdau mit Proteinase K und Pepsin, wurden die Pt-d(GpG)-DNA-Addukte mit dem monoklonalen adduktspezifischen RC-18 Antikörper gefärbt und mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. Die DNA der

Zellkerne wurde mit DAPI angefärbt. Die gespeicherten Koordinaten der zuvor detektierten epithelialen Zellen wurden erneut angefahren und die Zellen relokalisiert. Mit der Keyence Cellcount Software war es möglich, die Intensitäten der Pt-d(GpG)-Addukte und der DAPI-Kernfärbung der epithelialen Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen und somit DNA-Reparaturkinetiken zu erstellen, die mit dem tatsächlichen Therapieansprechen der Patienten assoziiert waren (Abb. 49). Diese Versuche legen nahe, dass die epithelialen Zellen während der Kultivierung einige Tage vital blieben und zelluläre Prozesse, wie z.B. die DNA-Reparatur weiterhin abliefen. Diese Methode kann ausgedehnt werden auf die Detektion von CTC-Subtypen, wie z. B. mesenchymale oder stammzellartige CTC sowie auf andere cisplatinbasierte Therapeutika, die bei verschiedenen Entitäten, wie z.B. dem Ovarialkarzinom, Blasenkarzinom und Kopf-Hals-Tumoren zum Einsatz kommen.

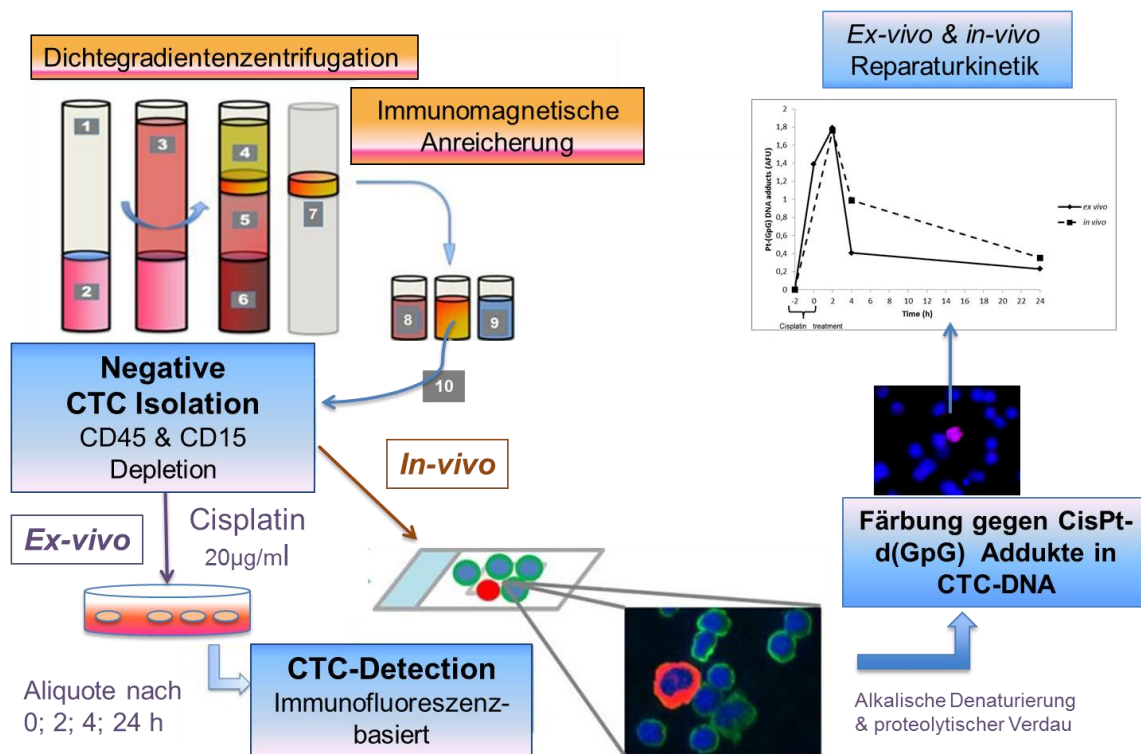


Abb.49: Schematische Darstellung des erweiterten Grundprinzips von CTC-Anreicherung und Cisplatinbehandlung. 1.Leucosep-Röhrchen; 2.Separationsmedium; 3.Vollblut/PBS-Gemisch; 4. Plasma; 5.Separationsmedium nach Zentrifugation; 6.Erythrozyten; 7.Interphase mit PBMNC incl. CTC (buffy coat); 8.Anti-CD45-Beads (Position A); 9.Anti-CD15-Beads (Position C); 10.depletierete bead-freie Zellsuspension inkl. CTC für Cisplatinbehandlung unter standardisierten Zellkulturbedingungen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung auf Adhäsionsobjektträgern.

5. DISKUSSION

5.1. Isolierung, Detektion und Charakterisierung von CTC-Subpopulationen

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Etablierung einer geeigneten Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von CTC aus Vollblut bei Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom. Dabei sollte die Methode in erster Linie dazu dienen, die wenigen, aber sehr heterogenen CTC vor dem Hintergrund der hämatopoetischen Zellen mittels mikroskopischer Verfahren qualitativ im Verlauf einer systemischen oder lokal-ablativen Therapie zu erfassen. Dies sollte insbesondere im Hinblick auf die möglichen Veränderungen innerhalb der Subgruppen im Sinne einer mehr mesenchymalen oder epithelialen Ausrichtung der CTC geschehen (EMT). Diese Veränderungen bzw. die vielfältigen verschiedenen Eigenschaften von CTC werden von den bisherigen Techniken nicht oder nur in geringem Umfang berücksichtigt.

Im Rahmen der Methodenetablierung wurde deutlich, dass am Klinikum bereits etablierte Techniken der (zirkulierenden) Tumorzell Darstellung für diese spezifische Fragestellung nicht geeignet waren. So war beispielsweise die in der hiesigen Pathologie klinisch etablierte ThinPrep®-Technik für die geringen Probenmengen der CTC-Suspensionen nicht geeignet. Bei der Isolierung mittels Dichtegradientenzentrifugation gefolgt von immunomagnetischer Anreicherung und mehrfachem Waschen, kam es dann für das oben genannte Verfahren zunächst zu einer Überführung in Cytolyt-Lösung gefolgt von Lagerung bei 4°C bis zur Aufarbeitung, was zu einem merklichen Verlust der Zellmorphologie führte. Die dann durchgeführte immunzytochemische Färbung mit Hilfe des Autostainers gegen Pan-CK, Hep-Par-1, AFP und CEA mit Peroxidase bzw. alkalischer Phosphatase führte zu nicht auswertbaren Ergebnissen aufgrund unspezifischer Färbungen. Es war hierbei kaum eine sichere visuelle Unterscheidung zwischen potentiellen CTC, hämatopoetischen Zellen und Beads möglich. Die in der Folge mittels Cellspin-Zentrifugiertechnik angefertigten Präparate und deren händische Färbung gegen Pan-CK bzw. Hep-Par-1 mit alkalischer Phosphatase führten zu einer besseren visuellen Auswertbarkeit der epithelialen Zellen. In weiteren Versuchen wurde das Separationsmedium optimiert, indem das stets frisch anzusetzende Percoll/Medium-Gemisch durch Ficoll ersetzt wurde. Die in Kooperation mit der Frauenklinik durchgeführten Spiking-Experimente mit Gesundblut und Karzinomzelllinien mit Dichtegradientenzentrifugation, jedoch ohne weitere Depletion hämatopoetischer Zellen, zeigten eine Wiederfindungsrate von 100% mit beiden Separationsmedien. Bei der auf einer Kombination von Dichtegradient und CD45-Depletion basierenden Anreicherung kam es mit Medium/Percoll-Gemisch zu einer Wiederfindung 42% und mit Ficoll zu 44%. Hier ist zu diskutieren, dass Zellkulturlinien im Sinne eines Spiking-Experimentes aufgrund

unterschiedlicher Anhaftung an Oberflächen nur bedingt mit frisch aus dem Blut entnommenen CTC vergleichbar sind. Es scheint jedoch durch die Depletion, die bei den anfangs verwendeten Detektionsmethoden mittels konventionellen immunhistochemischen Färbungen unabdingbar schien, zu einem Verlust an Zellen zu kommen, der auch für die Messung von CTC nicht auszuschliessen ist. Die immunzytochemische Detektion epithelialer Zellen in der EpCAM-positiven bead-gebundenen Fraktion war mit alkalischer Phosphatase möglich, schloss jedoch eine Gegenfärbung und auch die Anfärbung weiterer beispielsweise mesenchymaler oder stammzellartiger Merkmale aus. Dieses Verfahren wäre also möglicherweise ausreichend für eine quantitative Erfassung CK-positiver CTC, auch im Therapieverlauf, wie es beispielsweise mittels CellSearch-System (Invitrogen) bei Patientinnen mit Brustkrebs angewendet wird, kann aber keine Anwendung finden bei einer Erfassung der CTC-Subgruppen, insbesondere bei der Messung von Änderungen der Zelltypen und Oberflächeneigenschaften im Therapieverlauf (Yu, Bardia et al. 2013). So bietet die letzten Endes etablierte Methode der CellSpin-Zentrifugation der Blutproben auf Objektträger und der anschliessenden Anfärbung mit mehreren immunfluoreszenzgekoppelten Markern den Vorteil, solche Zelltypen und insbesondere Veränderungen in deren Konstellation im Therapieverlauf zu erfassen. Die Isolierungsmethode wurde dahingehend optimiert, dass von jeder Patientenprobe jeweils eine Negativselektion und eine EpCAM-positiv Selektion der CTC angefertigt wurden. Dabei wurde die CD45/CD15-depletierte bead-freie Negativselektion zur CTC-Detektion bzw. zur fluoreszenzbasierten Charakterisierung eingesetzt und die Positivselektion diente der molekularen Verlaufsmessung in EpCAM-positiven CTC. Die Ergebnisse der Spiking-Experimente bezüglich der Wiederfindungsrate und die Charakterisierung von Zellen mit gemischt hämatopoetischen und epithelialen Merkmalen (CD45+/EpCAM+; CD45+/CK+; etc.) legen nahe, dass die Depletion mittels immunomagnetischen Beads zu einem Verlust relevanter Zelltypen führen könnte. Daraus erschloss sich für alle aus dieser Doktorarbeit folgenden Projekte ein Verzicht auf die immunomagnetische Anreicherung und lediglich die Anwendung der Dichtegradientenzentrifugation gefolgt von einer schonenden, die Morphologie möglichst erhaltenden CellSpin-Zentrifugation, mit anschliessender Aufteilung auf mehrere Objektträger (maximal 5 Mio Zellen pro Slide) zur weiteren Subklassifizierung mittels mehrfach markierender Immunfluoreszenz.

Nach einigen Optimierungsschritten der IF anhand von Positivkontrollen (Hep G2, PBMNC, GIST) konnten in HCC-Patientenproben CK+/CD45- sowie EpCAM+/CD45- also auch ASGPR1+/CD45- Zellen detektiert werden. Die gleichzeitige Färbung der beiden epithelialen Marker Pan-CK und EpCAM vs. CD45 führte zur Detektion von CK+/EpCAM+/CD45- nebst CK+/EpCAM-/CD45-Zellen, d.h. einer EpCAM-negativen Subpopulation. Es konnten weitere verschiedene Zellpopulationen detektiert werden, wie CTC mit den mesenchymalen Markern

Vimentin bzw. N-Cadherin sowie Zellen mit epithelialen und mesenchymalen Eigenschaften. Wie von Kalluri et al. beschrieben wurde, können CTC im Prozess der EMT ihre epithelialen Eigenschaften wie das Oberflächenmolekül EpCAM und die intrazellulären Zytokeratine ablegen (Kalluri and Weinberg 2009). Die Detektion von CTC mit mesenchymalen Eigenschaften wurde auch von Gradilone et al. berichtet, in deren Studie der prognostische Wert von CTC mit mesenchymalen Markern in metastasierten Brustkrebspatientinnen untersucht wurde (Gradilone, Raimondi et al. 2011; Raimondi, Gradilone et al. 2011). Dabei wurden CTC mit CK und EMT-Markern charakterisiert und die Zunahme der mesenchymalen Eigenschaften in CTC korrelierte mit der Prognose während einer 24 monatigen Verlaufskontrolle. Die Daten legen nahe, dass das Vorkommen mesenchymaler Marker auf CTC mit einer schlechteren Prognose korrelierte, als die alleinige Expression von CK. In der vorliegenden Doktorarbeit konnte bestätigt werden, dass das Vorkommen mesenchymaler CTC mit der Zeit bis zur Progression der HCC-Patienten korreliert war. Allerdings deuten die Ergebnisse an, dass ein höherer Anteil an mesenchymalen Zellen mit einem besseren Therapieansprechen in HCC-Patienten assoziiert war. Dies könnte bedeuten, dass in der untersuchten Studiengruppe von Patienten mit HCC die epithelialen Zellen ein aggressiveres Potential hatten. Diese Annahme wurde dadurch verstärkt, dass die Gesamtzahl an CK-positiven Zellen höher war bei Patienten mit schlechterem Child-Status. Diese konträren Ergebnisse könnten eventuell mit den verschiedenen Entitäten (Brustkrebs vs. HCC), verschiedenen Therapien oder der kleinen Patientenzahl erklärbar sein.

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Studie bei fast allen Patienten epitheliale und mesenchymale CTC zu verschiedenen Anteilen im Blut detektiert werden, wobei nur einige dieser Patienten (4/11; 36%) Zellen mit beiden Eigenschaften auf der gleichen Zelle zeigten. Dies könnte ein Zeichen für verschiedene Stadien der EMT sein. Diese Patientengruppe ist jedoch zu klein, um derzeit substantielle Schlussfolgerungen ziehen zu können. Zusätzlich war ein Teil der CK-positiven sowie der CK- und EpCAM-positiven Zellen auch CD45-positiv. Zellen mit epithelialen und hämatopoetischen Eigenschaften wurden bereits von Yu et al beschrieben (Yu, Stott et al. 2011). Da die Identität dieser doppelt-positiven Zellen bisher unklar war, werden sie im klinischen Bereich bei der Zählung mittels kommerziell erhältlicher Systeme, wie z.B. CellSearch gemäß technischer Anleitung ausgeschlossen (An introduction to the CellSearch system; Circulating tumor cell test) . In der vorliegenden Studie wurden auch diese CD45-positiven Zellen analysiert, denn die zusätzliche CD45-Positivität könnte nicht nur spezifisch für hämatopoetische Zellen sein, sondern könnte hypothetisch während des Ruhezustands der CTC im Knochenmark oder durch Trogozytose im Blut angenommen worden sein. Während des Zell-Zell-Kontakts könnten Membranproteine übertragen werden, die Zellen mit einzigartigen Phenotypen und veränderten Funktionen hervorrufen (Joly and Hudrisier 2003). Zur Beantwortung dieser

Hypothese sind weiterführende Zellkultur- und Mausversuche notwendig. Dies kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschliessend geklärt werden.

CTC werden häufig als große Zellen mit sehr hohem Kern/Zytoplasma-Verhältnis beschrieben (Xu, Cao et al. 2011). Während der manuellen mikroskopischen Auswertung konnte eine signifikante phenotypische Heterogenität zwischen den Zellen verschiedener Proben und auch innerhalb derselben Patientenprobe festgestellt werden. Es wurden Zellen mit unterschiedlichen Signalintensitäten und variierenden Größen detektiert. Es gibt einige Publikationen, die ebenfalls signifikante Unterschiede der Zell- und auch Kerngrößen innerhalb derselben Probe beschreiben (Allard, Matera et al. 2004; Marrinucci, Bethel et al. 2007). Die Zellgrößenunterschiede sind relevant, da die Isolierung von CTC nach Größe (ISET; Isolation by size of epithelial tumor cells) eine der wenigen Markerfreien (semi) automatisierten Vorgehensweisen für die CTC-Detektion ist. In einer Studie von Vona et al wurde ISET bei Patienten mit Leberkrebs angewandt, um die klinische Bedeutung von CTC zu evaluieren. Dabei hatten 52% der insgesamt 44 Patienten detektierbare CTC und deren Verbreitung war signifikant mit dem Auftreten von multifokalen Tumoren, Portaltumorthrombose und Child-Staus B/C korreliert (Vona, Estepa et al. 2004). Hofman et al. verglich ISET mit dem CellSearch System anhand von NSCLC-Patientenblutproben. Die ISET-Filter wurden nach der CTC-Anreicherung doppelt immungefärbt gegen CK und Vimentin. Dabei wurden in einer Patientensubgruppe CTC mit nicht-hämatopoetischen, aber zytologisch malignen Kriterien entdeckt, die nur Vimentin exprimierten und vom CellSearch-System nicht erfasst wurden (Hofman, Ilie et al. 2011). Das CellSearch-System wurde von Schulze et al. angewendet, um EpCAM-positive CTC im Blut von HCC-Patienten zu detektieren. Das Ergebnis war eine Detektionsrate von 45% (14 von 31 Patienten) und eine signifikante Korrelation von epithelialen CTC mit AFP-Werten (Schulze, Beneken et al. 2011). Xu et al berichtete die Entwicklung und Validierung eines EpCAM-unabhängigen magnetischen Zellseparationssystems basierend auf der Interaktion des ausschließlich auf Hepatozyten vorkommenden ASGPR1 mit seinem Liganden. Isolierte CTC wurden anschließend mittels Immunfärbung gegen Hep-Par-1 identifiziert. Es konnten durchschnittlich 24 ± 19 CTCs pro 5 ml Blut in 81% der HCC-Patienten detektiert werden, d.h. die CTC-Zahl variierte zwischen 1-9 CTC pro ml Blut.

In den bisherigen Publikationen lag der Fokus auf der Erfassung der Gesamtzahl bestimmter CTC-Typen, z.B. abhängig von Größe oder epithelialen Oberflächenmarkern. In der vorliegenden Arbeit ging es um die Untersuchung der verschiedenen Eigenschaften detektierter nicht-hämatopoetischer Zellen im Blut bei Patienten mit HCC. Dafür wurde die negative CTC-Isolierung mit immunfluoreszenzbasierter Detektion kombiniert. Obwohl diese Methode keine vollständige Depletion der hämatopoetischen Zellen erreicht, bietet sie doch

die Möglichkeit, einen Überblick der Zellen in einer Patientenprobe zu gewinnen und zwischen verschiedenen Zelltypen zu unterscheiden sowie individuelle Patientenprofile (Ratios) zu erstellen. Im Gegensatz zum CellSearch-System ist diese Methode hinsichtlich der Auswertung eher komplex und nur bedingt automatisierbar. Da die Gesamtzellzahl jedes einzelnen Patienten variiert, ist eine absolute CTC-Quantifizierung der verschiedenen Subtypen mit dieser Methode nur begrenzt möglich. Es wurden verschiedene Ausschnitte von Patientenproben betrachtet und anstatt absoluter Zellzahlen wurden die Ratios der epithelialen und mesenchymalen Zellen errechnet, welche sich mit dem klinischen Status bzw. Therapieansprechen korrelieren lassen. Da die Methode auf einfachen Prinzipien wie Cellspin-Zentrifugation und klassischer Immunfärbung beruht, ist sie relativ günstig und perspektivisch im klinischen Bereich anwendbar. Sie bietet die Möglichkeit einer größenunabhängigen CTC-Isolierung, welche EpCAM einschließt, aber nicht allein auf EpCAM basiert.

5.2 Molekularbiologische Analysen von CTC

Zusätzlich zur vorrangigen Fragestellung sollte überprüft werden, ob in der epithelialen EpCAM-positiven Gruppe der CTC mRNA-expressionsbasierte Marker erfasst und gemessen werden können. Diese zusätzliche Zielstellung war insbesondere von Bedeutung vor dem Hintergrund des Kooperationsprojektes Bio.NRW, welches dieser Doktorarbeit zu Grunde liegt. In diesem Projekt werden aus Gewebe mittels genomischer und proteomischer Messtechniken neue Marker für das Therapieansprechen des HCC identifiziert und gemeinsam mit bereits bekannten Markern validiert. Diese Marker werden dabei aus Biopsaten oder Exsdaten gewonnen. Da jedoch im Verlauf einer Therapie Veränderungen im Expressionsmuster von Tumoren auftreten können, war es wichtig eine Möglichkeit zu haben, vorher definierte Marker im Verlauf messen und überprüfen zu können. In der für die vorliegende Promotion untersuchten Patientenpopulation scheinen die epithelialen CTC mit schlechterem klinischen Ansprechen auf lokal-ablative Verfahren und aggressiveren Tumoren bzw. höherem Child-Status assoziiert zu sein. Daher wurden die EpCAM-positiven CTC nach CD45-Depletion mit anti-EpCAM-Beads angereichert und für die Verlaufsmessung molekularer Marker im Rahmen des Bio.NRW Projektes verwendet. Folglich lagen die epithelialen CTC bead-gebunden in einer Suspension vor und konnten mittels Immunzytofärbung gegen Pan-CK und Hep-Par-1 visuell detektiert werden. Ein Nachteil dieser Vorgehensweise ist die Kontaminierung der CTC-Suspension mit hämatopoetischen Zellen, welche nicht depletiert wurden. Die Messungen der *EpCAM*- und *KRT18* mRNA Expressionen in den einzelnen Fraktionen (EpCAM+ angereichert, CD45+ hämatopoetisch, Rest bead-frei) zeigte jedoch eine signifikante Anreicherung in der EpCAM+ Zellfraktion. Diese Anreicherung bietet den Vorteil, dass bei der Messung molekularer

Marker der Hintergrund hämatopoetischer Zellen ansonsten vermutlich zu hoch wäre um sensitiv genug zu sein.

Die *KRT18* mRNA Expression in der verbleibenden bead-freien Restzellsuspension nach CD45-Depletion und nach Entnahme der EpCAM+ CTC war im Vergleich zur hämatopoetischen und zur EpCAM+ Zellfraktion signifikant höher. Die mRNA Expressionsanalyse bestätigt somit das via Immunfluoreszenz gezeigte Vorkommen einer EpCAM-negativen/KRT18-positiven CTC-Subgruppe, die ungebunden in der Restzellsuspension verbleibt. Die EpCAM-bead-basierte Anreicherungsmethode nach Dichtegradientenzentrifugation wurde ausführlich von Guo et al. evaluiert, wobei Gesundblut mit einer Verdünnungsreihe von Hep G2-Zellen versetzt wurde. Mit anschließender RT-PCR wurde die *AFP*-Expression gemessen und ein Detektionsminimum von 10 Zellen in 5 ml Blut wurde erreicht. In untersuchten klinischen Proben von HCC-Patienten reichte die Positiv-Rate von 53 bis 93% in Abhängigkeit vom Child-Status (A, B oder C) mit einer Gesamtpositivrate von 73% (Guo, Yao et al. 2007).

Da die Ergebnisse der Quantifizierung andeuteten, dass ein Anstieg des Anteils der epithelialen Zellen, mit schlechterem Outcome assoziiert war, wurde die angereicherte EpCAM-positive Zellfraktion zur Validierung von bekannten und durch die Kooperationspartner im Rahmen des Bio.NRW-Projektes erarbeiteten Markern aus Gewebe verwendet. Da SIRT die derzeit am häufigsten angewandte interventionelle Methode zur Behandlung der HCC-Patienten in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie ist, wurde ein gepaartes Set von 14 HCC Patienten ausgewählt, welche eine SIRT bekamen und entweder Progression oder Krankheitskontrolle (partiellles Ansprechen bzw. stabile Erkrankung) zeigten. Die EpCAM+ CTC wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit der oben beschriebenen Methode isoliert. Ziel dieses Vorgehens war, herauszufinden, ob es möglich ist, prädiktive bzw. prognostische Faktoren in epithelialen CTC von Patienten mit HCC im Therapieverlauf zu messen. Daher wurden Gene ausgesucht, die eine Rolle in der Karzinogenese und bei Leberkrankungen spielen bzw. im Konsortium Bio.NRW aus HCC-Gewebeproben etabliert wurden. Spearman Korrelation und multivariate Analysen zeigten signifikante Zusammenhänge zwischen *IGFBP1*, *HGFAC* und *AFP* mRNA Expressionen mit Progression nach SIRT. Interessanterweise wurde *AFP* vom Modell ausgeschlossen, wenn es zusammen mit der *IGFBP1* Expression getestet wurde. Nach Konvertierung der kontinuierlichen Daten in hoch-und niedrig exprimierende Gruppen mit entweder Progression oder Krankheitskontrolle durch Setzen des Trennpunkts bei der 50ten Perzentile, waren niedrige *IGFBP1* Expression und Bilirubin die einzigen Faktoren in dieser Patientenkohorte mit einer signifikanten unabhängigen Korrelation zum Therapieansprechen (Progression). Hohe *AFP* mRNA Expression und auch serologisches AFP zeigten einen Trend zur

Signifikanz und Bilirubin war signifikant korreliert mit dem Ansprechen (Progression). Interessanterweise zeigte die ROC-Kurvenanalyse, dass die niedrige *IGFBP1* Expression eine höhere Sensitivität und Spezifität hatte als die erhöhte *AFP* mRNA Expression, welche als bisher nützlichster bekannter Biomarker zur Vorhersage der Prognose gilt und mit sowohl Metastasierung als auch Wiederauftreten von HCC korreliert (Zhou, Liu et al. 2006; Guo, Yao et al. 2007). Der Kaplan Meier Test zeigte, dass die *IGFBP1* mRNA Expression auch signifikant mit dem PFS korrelierte. Zur Validierung der Daten wurde ein weiteres Set von 11 HCC-Patienten mit entweder Progression oder Ansprechen ausgewählt und die *IGFBP1* mRNA Expressionsanalyse wie oben beschrieben wiederholt. Die Spearman Korrelation und auch die multivariate Regression bestätigten die signifikante Assoziation von *IGFBP1* mit Progression nach SIRT. Die Änderung der *IGFBP1* mRNA Expression zwischen den einzelnen Zeitpunkten zeigte eine Möglichkeit zur Abschätzung des Therapieansprechens oder -versagens am Anfang eines Zyklus (Tag14). Während die Therapie einigen Patienten zu Gute kommt, verlieren andere Patienten wertvolle Zeit bis zur Evaluation des Therapieansprechens mittels CT-Verlaufskontrolle. Bisher gibt es keine Marker zur frühzeitigen Erkennung des Therapieerfolgs beim HCC.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen eine Studie von Gong et al., in der *IGFBP-1, 3 und 4* mRNA Expressionen in HCC signifikant herunterreguliert waren verglichen mit umgebendem zirrhotischem und gesundem Lebergewebe. Diese Ergebnisse verstärken das Konzept, dass IGFBPs eine wichtige inhibierende Rolle in der Entwicklung und dem Wachstum von HCC spielen (Gong, Cui et al. 2000). Weiterhin könnte die *IGFBP1* mRNA-Expression in EpCAM-positiven CTC ein geeigneter Marker zur Verlaufsbeobachtung bei lokalablativen Therapien sein, der im Vergleich zu bildgebenden Verfahren früher und minimal-invasiv, ohne Strahlenbelastung, messbar ist.

5.3. Kultivierung von CTC

Spiking-Experimente mit Gesundblut und Hep G2-Zellen dienten als Positivkontrollen, um zu belegen, dass adhärente epitheliale Zellen nach der o.g. Isolierungsmethode der Positivselektion noch vital und teilungsfähig waren. Für die Kultivierung von CTC aus Patientenblut wurden verschiedene Kulturgefäße, -beschichtungen und –medien getestet, wobei das selbst zusammengesetzte Medium (DMEM mit FBS, NEAA, Sodium Pyruvat, Gentamycin, Insulin, Hepes, Vitamin-Lösung, L-Ornithin, Ascorbinsäure und Dexamethason) sowie die Verwendung von Terasaki-Platten und kollagenbeschichteten Kulturschalen am besten geeignet waren. Die isolierten Zellen waren bis zu 21 Tage kultivierbar, jedoch ohne Proliferation. Eine Studie von Müller et al. zeigte mittels Immunfärbung gegen den Proliferationsmarker Ki-67, dass sich die meisten in Brustkrebspatientinnen detektierten CTC in einem nicht-proliferativen Zustand befanden (Muller, Stahmann et al. 2005). In der

Literatur wurde beschrieben, dass zelluläre Stressoren wie onkogene Aktivierung oder auch DNA-schädigende Chemotherapie das Arrest-Programm Seneszenz provozieren können, welches zum irreversiblen Ausstieg aus dem Zellzyklus führt (Kahlem, Dorken et al. 2004). Der durchgeführte β -Galactosidasebasierte Seneszenz-Test war in unseren Proben negativ; d.h. die isolierten CTC waren scheinbar nicht seneszent. Um die Proliferation der CTC zu untersuchen und anzuregen, sind weitere Zellkulturversuche erforderlich. Eine Möglichkeit wäre die Stimulierung mit Zytokinen oder die virale Transfektion, wobei es jedoch zu genetischen Veränderungen der CTC kommen könnte. Auch im nicht-proliferativen und nicht-seneszenten Zustand, können die kultivierten CTC für weiterführende Versuche genutzt werden. Das sogenannte „liquid holding“ konnte in über die vorgelegte Arbeit hinausgehenden Experimenten für die *ex vivo* Messung von Pt-d(GpG)-DNA-Addukten in CTC aus peripherem Blut von NSCLC-Patienten angewendet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die epithelialen Zellen während der Kultivierung einige Tage vital blieben und zelluläre Prozesse, wie z.B. die DNA-Reparatur aufrecht erhalten waren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Durch besseres Verständnis der Subtypen des hepatozellulären Karzinoms (HCC) auf molekularem Level sowie des Einflusses genetischer Faktoren könnten neuartige Ansätze zur frühzeitigen Diagnose und individuellen Therapie von Patienten entwickelt werden. Aufgrund der aus Patientensicht geringen Invasivität einer Blutabnahme und der Möglichkeit zur Verlaufsmessung könnten zirkulierende Tumorzellen (CTC) ein geeignetes „Surrogatgewebe“ für wiederholte Biomarkeruntersuchungen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine CTC-Isolierungsmethode entwickelt, wobei von jeder Patientenprobe jeweils eine Negativselektion und eine Epitheliales-Adhäsionsmolekül (EpCAM)-positive Selektion der CTC angefertigt wurde. Dabei wurde die Leukozyten-depletierte bead-freie Negativselektion zur CTC-Detektion bzw. zur fluoreszenzbasierten Charakterisierung eingesetzt und die Positivselektion diente der molekularen Verlaufsmessung in EpCAM-positiven CTC. In HCC-Patientenproben konnten mittels Immunfluoreszenzfärbungen Zellen mit epithelialen, mesenchymalen und leberspezifischen, und auch gemischten Eigenschaften detektiert werden. Desweiteren wurde die Verteilung der Subtypen als Ratios der epithelialen und mesenchymalen Zellen errechnet, welche sich mit dem klinischen Status bzw. Therapieansprechen korrelieren ließen. Da die Ergebnisse der Quantifizierung andeuteten, dass ein Anstieg des Anteils der epithelialen Zellen, mit schlechterem klinischen Verlauf assoziiert war, wurde die EpCAM-positive angereicherte Zellfraktion zur Validierung von bekannten und durch die Kooperationspartner im Rahmen des Bio.NRW-Projektes aus Gewebe erarbeiteten Marker verwendet. Da die selektive interne Radiotherapie (SIRT) die derzeit am häufigsten angewandte interventionelle Methode zur Behandlung der HCC-Patienten in der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie ist, wurde ein gepaartes Patientenset (Krankheitskontrolle vs. Progression) mit dieser Behandlung ausgewählt. Interessanterweise zeigte die Receiver Operation Characteristic (ROC)-Kurvenanalyse, dass die niedrige Expression von Insulin-like Growth Factor-binding Protein 1 (*IGFBP1*) eine höhere Sensitivität (80%) und Spezifität (80%) hatte als die erhöhte mRNA Expression von Alpha-Fetoprotein (AFP) welche in der Literatur als vielversprechender Marker zur Vorhersage der Prognose gilt. Spearman Korrelation und auch multivariate Regression bestätigten die signifikante Assoziation von *IGFBP1* ($p=0,027$) mit Progression nach SIRT. Die mittels der hier entwickelten Methode isolierten CTC zeigten keine Proliferation, überlebten jedoch bis zu 21 Tage unter Standardzellkulturbedingungen. In dieser Zeit waren die Zellen für weitergehende Experimente, wie der *ex vivo* Testung auf Platin-Resistenz bei Patienten mit Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) nutzbar.

7. REFERENZEN

1. (An introduction to the CellSearch system; Circulating tumor cell test). "Technology overview and analytical validation."
2. Allard, W. J., J. Matera, et al. (2004). "Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases." Clin Cancer Res **10**(20): 6897-6904.
3. Aoki, K. and M. M. Taketo (2007). "Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene." J Cell Sci **120**(19): 3327-3335.
4. Barrallo-Gimeno, A. and M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." Development **132**(14): 3151-3161.
5. Belghiti, J., Y. Panis, et al. (1991). "Intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis." Ann Surg **214**(2): 114-117.
6. Bi, W. R., C. Q. Yang, et al. (2012). "Transforming growth factor-beta1 induced epithelial-mesenchymal transition in hepatic fibrosis." Hepatogastroenterology **59**(118): 1960-1963.
7. Bortolami, M., R. Cardin, et al. (2008). "TGF-beta and hepatocellular carcinoma." Hepatology **47**(3): 1095-1095.
8. Bugianesi, E., E. Vanni, et al. (2007). "NASH and the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in type 2 diabetes." Curr Diab Rep **7**(3): 175-180.
9. Caillot, F., C. Derambure, et al. (2009). "Transient and etiology-related transcription regulation in cirrhosis prior to hepatocellular carcinoma occurrence." World J Gastroenterol **15**(3): 300-309.
10. Caselmann, W. H., H. E. Blum, et al. (1999). "[Guidelines of the German Society of Digestive and Metabolic Diseases for diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma. German Society of Digestive and Metabolic Diseases]." Z Gastroenterol **37**(5): 353-365.
11. Christofori, G. (2006). "New signals from the invasive front." Nature **441**(7092): 444-450.
12. Christoph, D. C., A. C. Hoffmann, et al. (2012). "Detection of circulating lung cancer cells with strong thymidylate synthase reactivity in the peripheral blood of a patient with pulmonary adenocarcinoma treated with pemetrexed." J Thorac Oncol **7**(4): 766-767.
13. Davis, G. L., J. Dempster, et al. (2008). "Hepatocellular carcinoma: management of an increasingly common problem." Proc (Bayl Univ Med Cent) **21**(3): 266-280.
14. Di Bisceglie, A. M., V. K. Rustgi, et al. (1988). "NIH conference. Hepatocellular carcinoma." Ann Intern Med **108**(3): 390-401.
15. Durand, F., J. M. Regimbeau, et al. (2001). "Assessment of the benefits and risks of percutaneous biopsy before surgical resection of hepatocellular carcinoma." J Hepatol **35**(2): 254-258.
16. El-Serag, H. B. (2007). "Epidemiology of hepatocellular carcinoma in USA." Hepatol Res **37 Suppl 2**: S88-94.
17. Ertle, J. M., M. Wichert, et al. (2011). "Sensitivity and Specificity of Alpha-Feto Protein (Afp), Lens Culinaris Agglutinin-Reactive Afp (Afp-L3) and Des-Gamma-Carboxyprothrombin (Dcp) as Tumor Markers in Patients with Hepatocellular Carcinoma (Hcc)." J Hepatol **54**: S384-S384.
18. Ferlay J, S. H., Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM (2010). "GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide:." IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.(Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 10/04/2013.).
19. Gong, Y., L. Cui, et al. (2000). "The expression of insulin-like growth factor binding proteins in human hepatocellular carcinoma." Mol Cell Biochem **207**(1-2): 101-104.
20. Gradilone, A., C. Raimondi, et al. (2011). "Circulating tumour cells lacking cytokeratin in breast cancer: the importance of being mesenchymal." J Cell Mol Med **15**(5): 1066-1070.

21. Guo, J., F. Yao, et al. (2007). "Detecting carcinoma cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma by immunomagnetic beads and rt-PCR." J Clin Gastroenterol **41**(8): 783-788.
22. Gurtsevitch, V. E. (2008). "Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis." Biochemistry (Mosc) **73**(5): 504-513.
23. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
24. Hoffmann, A.-C., A. Hartmann, et al. (2009). "Biomarker für die individualisierte Behandlung solider Tumoren." Onkopipeline **2**(4): 134-140.
25. Hoffmann, A. C., K. D. Danenberg, et al. (2009). "A three-gene signature for outcome in soft tissue sarcoma." Clin Cancer Res **15**(16): 5191-5198.
26. Hoffmann, A. C., R. Mori, et al. (2008). "High expression of heparanase is significantly associated with dedifferentiation and lymph node metastasis in patients with pancreatic ductal adenocarcinomas and correlated to PDGFA and via HIF1a to HB-EGF and bFGF." J Gastrointest Surg **12**(10): 1674-1681; discussion 1681-1672.
27. Hofman, V., M. I. Ilie, et al. (2011). "Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: comparison of the efficacy of the CellSearch Assay and the isolation by size of epithelial tumor cell method." Int J Cancer **129**(7): 1651-1660.
28. Huh, C. G., V. M. Factor, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4477-4482.
29. Jakobs, T. F., R. T. Hoffmann, et al. (2007). "Mid-term results in otherwise treatment refractory primary or secondary liver confined tumours treated with selective internal radiation therapy (SIRT) using (90)Yttrium resin-microspheres." Eur Radiol **17**(5): 1320-1330.
30. Jemal, A., F. Bray, et al. (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.
31. Joly, E. and D. Hudrisier (2003). "What is trogocytosis and what is its purpose?" Nat Immunol **4**(9): 815.
32. Kaiser, J. (2010). "Cancer's Circulation Problem." Science **327**(5969): 1072-1074.
33. Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
34. Kim, M. Y., T. Oskarsson, et al. (2009). "Tumor self-seeding by circulating cancer cells." Cell **139**(7): 1315-1326.
35. Kitajima, Y., T. Ide, et al. (2008). "Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer." Cancer Sci **99**(7): 1341-1347.
36. Klein, C. A., T. J. Blankenstein, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." Lancet **360**(9334): 683-689.
37. Krebs, M. G., J. M. Hou, et al. (2012). "Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches." J Thorac Oncol **7**(2): 306-315.
38. Kulik, L. M., B. I. Carr, et al. (2008). "Safety and efficacy of 90Y radiotherapy for hepatocellular carcinoma with and without portal vein thrombosis." Hepatology **47**(1): 71-81.
39. Lacroix, M. (2006). "Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells." Endocr Relat Cancer **13**(4): 1033-1067.
40. Lianidou, E. S. and A. Markou (2011). "Circulating tumor cells in breast cancer: detection systems, molecular characterization, and future challenges." Clin Chem **57**(9): 1242-1255.
41. Lianidou, E. S., D. Mavroudis, et al. (2010). "What's new on circulating tumor cells? A meeting report." Breast Cancer Res **12**(4): 307.
42. Liao, D. and R. S. Johnson (2007). "Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer." Cancer Metastasis Rev **26**(2): 281-290.

43. Lin, H., M. Balic, et al. (2011). "Disseminated and circulating tumor cells: Role in effective cancer management." Crit Rev Oncol Hematol **77**(1): 1-11.
44. Liu, S., N. Li, et al. (2013). "Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 by Hepatocellular Carcinoma Stem Cells and Circulating Tumor Cells." Gastroenterology.
45. Marrinucci, D., K. Bethel, et al. (2007). "Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells." Hum Pathol **38**(3): 514-519.
46. Mego, M., S. A. Mani, et al. (2012). "Expression of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in primary breast cancer: The effect of neoadjuvant therapy." Int J Cancer **130**(4): 808-816.
47. Moldenhauer, G., F. Momburg, et al. (1987). "Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker." Br J Cancer **56**(6): 714-721.
48. Momburg, F., G. Moldenhauer, et al. (1987). "Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues." Cancer Res **47**(11): 2883-2891.
49. Moustakas, A. and C. H. Heldin (2007). "Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression." Cancer Sci **98**(10): 1512-1520.
50. Mulholland, D. J., N. Kobayashi, et al. (2012). "Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells." Cancer Res **72**(7): 1878-1889.
51. Nakamura, S., H. Yagata, et al. (2010). "Multi-center study evaluating circulating tumor cells as a surrogate for response to treatment and overall survival in metastatic breast cancer." Breast Cancer **17**(3): 199-204.
52. Nel, I., J. M. Ertel, et al. (2012). "A novel method for the detection of different subgroups of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma." Hepatology **56**: 457a-457a.
53. Okegawa, T., R. C. Pong, et al. (2004). "The role of cell adhesion molecule in cancer progression and its application in cancer therapy." Acta Biochim Pol **51**(2): 445-457.
54. Pantel, K., R. H. Brakenhoff, et al. (2008). "Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells." Nat Rev Cancer **8**(5): 329-340.
55. Pantel, K., E. Deneve, et al. (2012). "Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases." Clin Chem **58**(5): 936-940.
56. Park, Y., T. Kitahara, et al. (2011). "Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer." World J Clin Oncol **2**(8): 303-310.
57. Pestrin, M., S. Bessi, et al. (2009). "Correlation of HER2 status between primary tumors and corresponding circulating tumor cells in advanced breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **118**(3): 523-530.
58. Radeleff, B. A., U. Stampfl, et al. (2012). "Transarterial ablation of hepatocellular carcinoma." Radiologe **52**(1): 44-55.
59. Raimondi, C., A. Gradilone, et al. (2011). "Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients." Breast Cancer Res Treat **130**(2): 449-455.
60. Riethdorf, S., H. Fritsche, et al. (2007). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system." Clin Cancer Res **13**(3): 920-928.
61. Riethdorf, S. and K. Pantel (2010). "Advancing personalized cancer therapy by detection and characterization of circulating carcinoma cells." Ann N Y Acad Sci **1210**: 66-77.
62. Roskams, T., R. De Vos, et al. (1998). "Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man." J Hepatol **29**(3): 455-463.
63. Salem, R., R. J. Lewandowski, et al. (2011). "Radioembolization results in longer time-to-progression and reduced toxicity compared with chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **140**(2): 497-507 e492.
64. Sanyal, A. J., S. K. Yoon, et al. (2010). "The etiology of hepatocellular carcinoma and consequences for treatment." Oncologist **15 Suppl 4**: 14-22.

65. Sass, D. A., P. Chang, et al. (2005). "Nonalcoholic fatty liver disease: a clinical review." Dig Dis Sci **50**(1): 171-180.
66. Schulze, K., C. Beneken, et al. (2011). "Detection of Epcam-Positive Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma - a Pilot Study." Hepatology **54**: 1357a-1357a.
67. Sheen, I. S., K. S. Jeng, et al. (2004). "Does surgical resection of hepatocellular carcinoma accelerate cancer dissemination?" World J Gastroenterol **10**(1): 31-36.
68. Sun, Y. F., Y. Xu, et al. (2012). "Circulating stem cell-like EpCAM(+) tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection." Hepatology.
69. Sun, Y. F., X. R. Yang, et al. (2011). "Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance." J Cancer Res Clin Oncol **137**(8): 1151-1173.
70. Tewes, M., B. Aktas, et al. (2009). "Molecular profiling and predictive value of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: an option for monitoring response to breast cancer related therapies." Breast Cancer Res Treat **115**(3): 581-590.
71. Thiery, J. P. and J. P. Sleeman (2006). "Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 131-142.
72. Trzpis, M., P. M. McLaughlin, et al. (2007). "Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule." Am J Pathol **171**(2): 386-395.
73. Tsuchiya, K., M. Komuta, et al. (2011). "Expression of keratin 19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation." Oncology **80**(3-4): 278-288.
74. Uenishi, T., S. Kubo, et al. (2003). "Cytokeratin 19 expression in hepatocellular carcinoma predicts early postoperative recurrence." Cancer Sci **94**(10): 851-857.
75. Vaupel, P., O. Thews, et al. (2001). "Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia." Med Oncol **18**(4): 243-259.
76. Volkmann, X., U. Fischer, et al. (2007). "Increased hepatotoxicity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in diseased human liver." Hepatology **46**(5): 1498-1508.
77. Vona, G., L. Estepa, et al. (2004). "Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer." Hepatology **39**(3): 792-797.
78. Waguri, N., T. Suda, et al. (2003). "Sensitive and specific detection of circulating cancer cells in patients with hepatocellular carcinoma; detection of human telomerase reverse transcriptase messenger RNA after immunomagnetic separation." Clin Cancer Res **9**(8): 3004-3011.
79. Wang, X. W., S. P. Hussain, et al. (2002). "Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma." Toxicology **181-182**: 43-47.
80. Weidemann, A. and R. S. Johnson (2008). "Biology of HIF-1alpha." Cell Death Differ **15**(4): 621-627.
81. Welsh, J. S., A. S. Kennedy, et al. (2006). "Selective Internal Radiation Therapy (SIRT) for liver metastases secondary to colorectal adenocarcinoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys **66**(2 Suppl): S62-73.
82. Xu, W., L. Cao, et al. (2011). "Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separation strategy." Clin Cancer Res **17**(11): 3783-3793.
83. Yanagita, K., M. Nagaike, et al. (1992). "Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs." Biochem Biophys Res Commun **182**(2): 802-809.
84. Yang, J. and R. A. Weinberg (2008). "Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis." Dev Cell **14**(6): 818-829.
85. Yang, L., S. Inokuchi, et al. (2013). "Transforming Growth Factor-beta Signaling in Hepatocytes Promotes Hepatic Fibrosis and Carcinogenesis in Mice with Hepatocyte-Specific Deletion of TAK1." Gastroenterology.
86. Yang, X. R., Y. Xu, et al. (2008). "Cytokeratin 10 and cytokeratin 19: predictive markers for poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients after curative resection." Clin Cancer Res **14**(12): 3850-3859.

87. Yao, D. F., Z. Z. Dong, et al. (2007). "Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **6**(3): 241-247.
88. Yu, M., A. Bardia, et al. (2013). "Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition." Science **339**(6119): 580-584.
89. Yu, M., S. Stott, et al. (2011). "Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization." J Cell Biol **192**(3): 373-382.
90. Zhou, L., J. Liu, et al. (2006). "Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma." World Journal of Gastroenterology **12**(8): 1175-1181.
91. Zhuang, P. Y., J. B. Zhang, et al. (2008). "Two pathologic types of hepatocellular carcinoma with lymph node metastasis with distinct prognosis on the basis of CK19 expression in tumor." Cancer **112**(12): 2740-2748.

8. ANHANG

8.1. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A549	Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells
Abb	Abbildung
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	Adenomatous polyposis coli
BPE	Bovine Pituitary Extract; Rinderhypophysenextrakt
BSA	Bovines Serumalbumin
CD15	Cluster of differentiation antigen 15
CD45	Cluster of differentiation antigen 45
CK	Cytokeratin
CTC	Circulating tumor cells; zirkulierende Tumorzellen
DNA	Deoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTT	Dithiothreito
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EpCAM	Epithelial adhesion molecule; Oberflächenadhäsionsmolekül
Et al	et alii; und andere
FBS	Fötales bovines Serumalbumin
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramm

GIST	Gastrointestinale Stromatumore
h	Stunden
HBV	Hepatitis B Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCT116	Humane Kolonkarzinom-Zelllinie
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HepG2	Humane hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie
HGFAC	Hepatocyte growth factor activator
Hif1 α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
IGFBP	Insulin-like growth factor-binding protein
KRT18	Kertain 18
KRT19	Kertain 19
min	Minuten
MITO	Serum Extender mit Hormonen, Wachstumsfaktoren etc
ml	Milliliter
NAFLD	Nichtalkoholische Fettleber
NASH	Steatohepatitis
NSCLC	non-small lung cancer; Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells; Periphere mononukleare Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PR	Partial Response; Partielles Ansprechen
qRT-PCR	quantitative reverse transcriptase –real time polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid ; Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic

SD	Stable Disease; Stabile Erkrankung
SIRT	Selektive interne Radiotherapie
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TGF β	Transforming growth factor beta

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt **Priv.-Doz. Dr. med. Andreas-Claudius Hoffmann**, für das sehr interessante Projekt, die außerordentlich engagierte Auseinandersetzung mit den Ergebnissen, die stete Motivation und natürlich die Finanzierung.

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. med. Martin Schuler**, Direktor der Inneren Klinik (Tumorforschung) am Westdeutschen Tumorzentrum für die Stellung von Mitteln und Räumen sowie für die Unterstützung und kritische Auseinandersetzung.

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. med. Guido Gerken**, Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, für die Unterstützung bei der Kooperation.

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. med. Kurt Werner Schmid**, Direktor des Instituts für Pathologie und Neuropathologie, für die Unterstützung bei der Kooperation.

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. med. Hideo Andreas Baba**, Vertreter des Institutsdirektors, Institut für Pathologie und Neuropathologie, für die mühevollen Unterstützung bei der Beurteilung der Proben und der Detektion der CTC.

Ich danke **Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ralf Küppers**, Geschäftsführender Direktor des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung), für die Unterstützung bei der Etablierung der Methode und die beratenden Gespräche.

Ich danke **Prof. Dr. rer. nat. Sabine Kasimir-Bauer**, Leiterin des wissenschaftlichen Labors der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, für die Unterstützung bei der Methodenetablierung und für die vielen motivierenden Gespräche.

Ich bedanke mich besonders bei **Prof. Dr. med. Jörg Friedrich Schlaak**, stellvertretender Direktor der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, für die finanzielle Ermöglichung dieser Doktorarbeit mittels eines anfänglichen Stipendiums und für die stete klinische Anleitung.

Ich danke **Prof. Dr. Helmut E. Meyer**, Ruhr-Universität Bochum, Zentrum für klinische Forschung (ZKF), für die Kooperation und die kritische Diskussion der Ergebnisse.

Ein großer Dank geht auch an das gesamte **PROFILE Team**.

Ich danke **Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Bauer** und seinem extrem kooperativen Laborteam für die stete Hilfsbereitschaft und die Versorgung mit GIST-Zellen.

LEBENS LAUF

Name: Ivonne Nel (geb.Schuhr)
 Wohnort: 45147 Essen
 Geburtsdatum und -ort: 18.02.1982 in Frankfurt (Oder)
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: verheiratet, 1 Kind

BILDUNGSGANG

Promotion	Universitätsklinikum Essen
11/2009	Innere Klinik (Tumorforschung); M.O.R.E.-Molekulare Onkologische Risikoprofil-Erforschung AG-Leiter: Prov.-Doz. Dr. med. A.Cl. Hoffmann
Studium	Technische Universität Dresden
10/2001 - 03/2008	<i>Diplomlebensmittelchemikerin</i>
04/2007 - 02/2008	<u>Diplomarbeit</u> in der PROMEC Unit, Medical Research Council, Tygerberg, Südafrika Thema: "Investigation of the antioxidant property of C18:1(9) in primary hepatocytes and Hep G2 cancer cells"
Schule	Friedrichsgymnasium Frankfurt (Oder)
09/1994 - 06/2001	<i>Abitur</i>

PRÄSENTATIONEN AUF KONFERENZEN

Characterization and potential clinical implications of different subtypes of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma. Nel I., Baba H. A, Ertle J., Weber F., Sitek B., Stephan C., Meyer H. E, Schlaak J. F, Hoffmann A. C. German Association for the Study of the Liver (GASL) held in Hannover, Germany, from 25-26 January 2013.

Detection of epithelial and mesenchymal circulating tumor cell sub-populations in patients with hepatocellular carcinoma. I. Nel, J. Ertle, H.A. Baba, F. Weber, B. Sitek, C. Stephan, H.E. Meyer, J.F. Schlaak, A.-C. Hoffmann. Poster presentation at the "Advances in

Circulating Tumour Cells” (ACTC) Meeting held in Athens, Greece, from 26-29 September 2012.

IGFBP1 Expression Levels In Circulating Tumor Cells Predict Response To Selective Internal Radiation Therapy (SIRT) In Patients With Hepatocellular Carcinoma. Ivonne Nel , Judith Ertle , Hideo Baba , Frank Weber , Barbara Sitek , Christian Stephan , Helmut E. Meyer , Jörg F.Schlaak , Andreas-Claudius Hoffmann. Poster presentation at the “International Liver Cancer Association Sixth Annual Conference” (ILCA) held in Berlin, Germany, from 14-16 September 2012.

Pre-therapeutic ex-vivo repair kinetics of cisplatin DNA-adducts in circulating tumor cells (CTC) as platinum resistance test. I. Nel, T.C. Gauler, A.C. Nickel, S. Alotaibi, J. Thomale, M. Schuler, A.C. Hoffmann. BTOG Annual Meeting, Dublin Jan 2013, Poster Preis.

Combined analysis of AFP, AFP-L3 and DCP is superior to AFP alone in the detection of hepatocellular carcinoma in European patients. I Schuhr, J Ertle, G Gerken, JF Schlaak. EASL SPECIAL CONFERENCE - Hepatocellular Carcinoma: from Genomics to Treatment held in Dubrovnik, Croatia, June 25-26; 2010.

The antioxidant potential of oleic acid (C18:1n-9) and effect on cell survival in carcinogenesis. Schuhr I, Abel S and Gelderblom WCA. South Africa. PAEMS 2008, Cape Town International Convention Centre, 3 - 5 November 2008; Posterpreis.

PRAKTIKA/ WEITERBILDUNG

10/2006 - 03/2007	Studentische Analytikerin bei “Vital Health Foods”, Kuils River, Südafrika
-------------------	--